



Etude comparée de la régulation par le calcium de l'adressage de l'aquaporine-3 et- de l'aquaporine-2 dans les cellules épithéliales

Yemadjro Elympe Vodouhé

► To cite this version:

Yemadjro Elympe Vodouhé. Etude comparée de la régulation par le calcium de l'adressage de l'aquaporine-3 et- de l'aquaporine-2 dans les cellules épithéliales. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT: 2012PA11T015 . tel-00934562

HAL Id: tel-00934562

<https://theses.hal.science/tel-00934562>

Submitted on 22 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE MEDECINE PARIS SUD

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Champ disciplinaire : Biochimie, biologie cellulaire et moléculaire

Ecole Doctorale : Signalisation et Réseaux Intégratifs en Biologie ED 419

Présentée et soutenue publiquement

par

Elympe Y. VODOUHE

Le 12 Avril 2012

**ETUDE COMPAREE DE LA REGULATION PAR LE
CALCIUM DE L'ADRESSAGE DE L'AQUAPORINE-3
ET DE L'AQUAPORINE-2 DANS LES CELLULES
EPITHELIALES**

Devant le jury composé de :

M. Jean-Pierre Mauger	Président
Mme. Christine Delporte	Rapporteur
M. Bela Papp	Rapporteur
Mme. Agnès Delaunay-Moisan	Examineur
M. Jean-Marc Verbavatz	Examineur
M. Marc Le Maire	Directeur de thèse

RÉSUMÉ

Les aquaporines (AQPs) sont de petites protéines membranaires permettant le passage facilité de l'eau, du glycérol et de certains solutés à travers les membranes biologiques. Elles jouent d'importants rôles de transport transmembranaires ou transcellulaires dans diverses cellules telles que les cellules rénales, mais aussi dans les kératinocytes de l'épiderme. L'épiderme est un épithélium pluristratifié en constant renouvellement. Le calcium extracellulaire joue un rôle important dans le mécanisme de différenciation des kératinocytes.

Dans ce travail, nous avons montré que la différenciation induite par le calcium de kératinocytes humains s'accompagne de l'adressage de l'aquaporine-3 (AQP3) du réticulum endoplasmique, vers les membranes plasmiques. Pour étudier la cinétique et les bases moléculaires de cette régulation, notre objectif était de produire des clones stables d'une lignée de kératinocytes humains en culture (HaCat) exprimant une AQP3 fluorescente. Malgré plusieurs tentatives, je n'ai pas pu obtenir ces clones stables. J'ai alors choisi un autre modèle de cellules épithéliales en culture; les cellules MDCK. Nous avons produit deux lignées stables de MDCK exprimant des aquaporines fluorescentes: l'AQP3-GFP et l'AQP2-mCherry. De manière intéressante, dans les cellules MDCK, l'AQP3 -GFP reproduit la régulation de son adressage par le calcium observée dans les kératinocytes humains; dans des cellules MDCK cultivées en présence de 0,15mM de Ca^{2+} , l'AQP3-GFP est localisée dans le réticulum endoplasmique, tandis qu'à 1,5mM de Ca^{2+} extracellulaire, celle-ci est localisée aux membranes plasmiques. Dans les mêmes conditions, l'AQP2-mCherry conserve une localisation intracellulaire. Par des expériences de « calcium switch », nous avons étudié la cinétique du trafic cellulaire de l'AQP3 et montré que l'adressage de l'AQP3 à la membrane plasmique en réponse au calcium est lent (6h minimum) et semble dépendant non seulement de la différenciation cellulaire, mais aussi de l'établissement de la polarité cellulaire. A l'aide d'inhibiteurs de la PLC et de la PKC, nous avons montré l'implication de cette voie de signalisation, qui dépend du calcium, dans le trafic de l'AQP3. De plus, l'adressage membranaire de l'AQP3 est dépendant du cytosquelette d'actine.

En conclusion, nous montrons pour la première fois une régulation du trafic intracellulaire d'une aquaporine par le calcium au cours de la différenciation et de l'établissement de la polarité cellulaire de cellules épithéliales. Cette régulation permet probablement l'hydratation de l'épiderme humain, sans remettre en cause la barrière de perméabilité que constitue la peau.

ABSTRACT

The aquaporins (AQPs) are small membrane proteins forming water channels and transporters for small solutes like glycerol. The AQPs play important roles in transmembrane or transcellular transports in various cells, like kidney cells, but also in skin epidermis keratinocytes. The skin epidermis is a pluristratified epithelium, undergoing continuous renewal. Extracellular calcium plays an important role in the differentiation of keratinocytes.

In this work, we demonstrate that during calcium-induced differentiation of human keratinocytes, aquaporin-3 (AQP3) is translocated from the endoplasmic reticulum to plasma membranes. In order to study the kinetics and the molecular bases of this regulation, our goal was to produce stable clones of a human keratinocyte cell line (HaCat) expressing a fluorescent AQP3. Despite several trials, I was not able to obtain such clones. Thus I pursued with another epithelial cell line: MDCK cells. We have produced two lines of MDCK cells stably expressing fluorescent AQPs: AQP3-GFP and AQP2-mCherry. Interestingly in MDCK cells, AQP3-GFP reproduced the regulated intracellular trafficking observed in human keratinocytes; in MDCK cells grown in a medium containing 0.15 mM Ca^{2+} , AQP3-GFP was localized in the endoplasmic reticulum. After extracellular Ca^{2+} was raised to 1.5 mM, AQP3-GFP was seen in plasma membranes. In the same conditions, AQP2-mCherry remained intracellular throughout the experiment. With calcium-switch experiments, we have then studied the kinetics of AQP3 trafficking. We have shown that targeting of AQP3 to plasma membranes is a slow process (at least 6h) and seems dependent not only of cell differentiation, but also on the establishment of cell polarity. Using inhibitors of PLC and PKC, we have shown the implication of this signalling pathway, which is dependent on calcium, in AQP3 trafficking. In addition we found that plasma membrane expression of AQP3 is dependent on actin cytoskeleton.

In conclusion, we show for the first time a regulation of intracellular trafficking of an aquaporin in calcium-induced differentiation and after establishment of epithelial cell polarity. This regulation likely allows human skin epidermis hydration without compromising the permeability barrier of skin.

REMERCIEMENTS

Je souhaite d'abord remercier tous les membres du jury d'avoir accepté de lire et de juger mon travail.

Merci à Marc Le Maire d'avoir accepté mon inscription pour le Master et de m'avoir proposé un sujet de stage au CEA.

Merci à toi, Jean- marc VERBAVATZ pour la confiance que tu as placée en moi en me prenant pour mon stage de Master 2 et m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse. Je savais dès les premiers échanges qu'on a eus, que travailler avec toi serait très enrichissant. Merci pour tes conseils avisés et pour ces moments passés ensemble.

Violaine DAVID, tu as été d'un grand secours pour moi et surtout pendant les derniers moments de ce travail. Je te dis un grand merci.

Merci à Mathieu BOURY-JAMOT, Jean DARASPE, Wael KHAZEN, Nancy ABOU ZEID, Manel BOUMEDIENE, Gwenaëlle LEPAVEC, Isabelle BOISDE, Alain RAMBOURG pour leur disponibilité, leur aide ainsi que tous les moments passés.

Merci à Ahmed ZAHRAOUI pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour les moments passés.

Merci à Anis BESSADOK et à Kevin ROYER pour les « after » foot à la cafet et pour leur soutien tout au long de ces années.

Merci à Rodrigue, Clément, Urbain, Constance et Cynthia pour votre sens de l'amitié et les moments passés ensemble.

Je ne saurais vous citer tous, merci à tous mes amis (es) de la cité avec qui j'ai passé des moments conviviaux. Une pensée spéciale pour Vénissia DUBOCQ, Cathy LEMERCIER et Sara DIAS.

A toutes mes « sal.. » de la section Foot du CEA Saclay, Saclay c'est vraiment une famille. Chaque moment passé avec vous m'a permis de me relaxer et de recharger les batteries pour continuer cette thèse. J'ai passé des moments inoubliables avec vous. Merci les gars.

Merci à Alphonse SEZAN pour le travail abattu depuis Cotonou.

Un grand merci à mes parents, qui m'ont tout donné et pour leur soutien permanent.

A mes frères et sœurs, votre soutien moral et vos interventions ont été pour moi une source inépuisable de consolation et d'enthousiasme. Merci pour tout.

A mes amis(es), en particulier Kamil-dine BOURAÏMA et Solange FAVI, pour votre présence dans les moments de joie comme votre soutien au cours des périodes difficiles, je vous dis simplement merci.

Merci de me pardonner toutes imperfections qui persistent dans ce manuscrit malgré plusieurs relectures.

TABLES DES MATIERES

Introduction générale.....	13
A-LES AQUAPORINES.....	14
I. La perméabilité hydrique	14
II. La découverte: L'Aquaporine 1.....	16
III. La famille des aquaporines.....	17
IV. La structure.....	19
V. Fonctions des aquaporines.....	22
VI. 1. Aquaporines et transport d'eau	23
V. 2. Aquaporines et transport du glycérol	27
V. 3. Autres fonctions des aquaporines.....	30
B. LA PEAU HUMAINE.....	32
I. L'hypoderme.....	33
II. Le derme.....	34
III. L'épiderme.....	35
III. 1. Structure de l'épiderme.....	35
III. 1. 1. Le stratum germinativum	36
III. 1. 2. Le stratum spinosum	38
III. 1. 3. Le stratum granulosum.....	39
III. 1. 4. Le stratum corneum	40
III. 2. Jonctions épidermiques: les jonctions imperméables	40
III. 3. Fonctions de l'épiderme	41
III. 4. Aquaporines de la peau.....	42
C. LA DIFFERENCIATION EPIDERMIQUE.....	45
I. Les étapes de la différenciation épidermique	45
II. Agents inducteurs de la différenciation kératinocytaire.....	50

II.	1. Les facteurs de croissance	50
II.	1. 1. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	50
II.	1. 2. Transforming Growth Factor (TGF)	51
II.	2. Les rétinoïdes	53
II.	3. La vitamine D3	54
II.	3. 1. Production	54
II.	3. 2. Calcium et $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	55
II.	4. Calcium	57
II.	4. 1. Les canaux calciques	58
II.	4. 2. Contrôle de l'homéostasie calcique	60
II.	4. 3. Calcium et kératinocytes	62
II.	4. 3. 1. Effets du calcium sur la culture des kératinocytes	62
II.	4. 3. 2. La signalisation calcique dans les kératinocytes	64
III.	La polarité cellulaire	66
D.	TRAFIC DES AQUAPORINES	68
I.	Transport vésiculaire entre les compartiments intracellulaires	68
II.	Trafic de l'AQP2	71
	Objectifs du travail	77
E.	ADRESSAGE DE L'AQP3 DANS L'EPIDERME	78
	Matériels et Méthodes	81
I.	Culture cellulaire	82
I.	1. Culture primaire de kératinocytes	82
I.	2. HaCat	82
I.	3. MDCK	82
I.	4. Repiquage	83
I.	5. Congélation	84
I.	6. Décongélation	84

II.	Expression de protéines recombinantes	84
II.	1. Clonage	84
II.	2. Transfection stable	86
III.	Immunolocalisation cellulaire	87
III.	1. Principe général	87
III.	2. Microscope à épifluorescence	88
III.	3. Microscope confocal	88
III.	4. Protocole d'immunomarquage	89
	Résultats	91
I.	Régulation de l'adressage de l'aquaporine 3 au cours de la différenciation induite par le calcium dans les cultures primaires de kératinocytes	92
II.	Résultats des transfections	94
III.	Effets du calcium sur l'adressage et sur la localisation des aquaporines dans les cellules MDCK	101
III.1	Effets du calcium sur l'adressage de l'aquaporine 3 et de l'aquaporine 2 sur les cellules MDCK	101
III. 2	Identification des compartiments cellulaires de l'aquaporine 3 et de l'aquaporine 2 dans les cellules MDCK	105
III.	3 Cinétique d'adressage de l'aquaporine 3 dans les cellules MDCK.	114
IV.	Voies de signalisations impliquées dans l'adressage de l'AQP3	117
V.	Rôles du cytosquelette	122
	Discussion	125
I.	Obtention de clones stables exprimant les aquaporines fluorescentes 2 et 3	126
II.	Calcium et adressage des aquaporines	128
II.	1. Adressage de l'AQP3	128
II.	2. Adressage de l'AQP2	132
III.	Bases moléculaires du trafic de l'aquaporine 3 dans les cellules MDCK	133
	Conclusions et perspectives	137

Références bibliographiques	141
-----------------------------------	-----

LISTE DES ABREVIATIONS ET ANGLICISMES

AC : Adénylate cyclase

ADH: Antidiuretic hormone

ADN: Acide désoxyribonucléique

AMPC: Adénosine monophosphate cyclique

AQP : Aquaporine

ARNm: ARN messenger

BET: Bromure d'Ethidium

Ca²⁺: Calcium

Ca_i: Calcium intracellulaire

CaR: Calcium Receptor

CaRE: Calcium Responsive Element

CHIP28 : Channel-like integral membrane protein of 28KDa

CRBP: Cellular Retinol Binding Protein

DAG: Diacylglycérol

DMBA : 7,12-dimethylbenz anthracene

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Ea : Energie d'activation

EGF: Epidermal Growth Factor

EGFR: EGF Receptor

EMEM: Eagle's Minimum Essential Medium

GFP: Green Fluorescent Protein

GLP: Glycerol facilitator-like protein

GLUT4 : Glucose 4

HaCat: Human keratinocyte cell line

HB-EGF: Heparin Binding EGF

IICR : IP3-induced calcium release

IP3: Inositol triphosphate

JAM : Junctional Adhesion Molecule

K: Kératine

KBM: Keratinocyte Basal Medium

KO: Knock-out

KSFM: Keratinocyte Serum-Free Medium

LB: Luria-Bertani

MDCK: Madin-Darby canine Kidney

MIP : Major intrinsic protein

MIP26: Major intrinsic protein of 26KDa

MMPs : Matrix Mettaloproteinases

NDI:Nephrogenic diabetes insipidus

NMF : Natural Moisturizng Factor

NPA: Asparagine Proline Alanine

OSER: Organized Smooth Endoplasmic Reticulum

PBS: Phospahte Buffer Saline

PCT: Progenitor Cell targeted

Pd : Perméabilité diffusionnelle

Pf : Perméabilité osmotique

PI3K: phosphatidyl inositol 3 Kinase

PIP2: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate membranaire

PKA: Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PLC: Phospholipase C

PTH: Parathyroïdienne

RAR : Retinoic Acid Receptor

RCPG: Récepteur couple aux protéines G

RE: Réticulum endoplasmique

ROCs: Receptor-operated channels

RXR : Retinoid X Receptor

RYR : Récepteur à la ryanodine

SERCA: Sarco endoplasmique reticulum calcium ATPase

SOCs Second-messenger-operated channels:

SPRs: Small Proline Rich proteins

SVF : Sérum de veau fœtal

TG: Transglutaminase

TGF: Transforming Growth Factor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TPA : 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

UV: Ultra-violet

VLDL : Very-low-density lipoprotein

VOCs: Voltage-operated channels

WT: Wild type

ZO : Zonula Occludens proteins

Introduction générale

A-LES AQUAPORINES

Le fonctionnement d'une cellule, nécessite des échanges de matière et d'information avec le milieu extérieur. Chaque cellule est entourée d'une membrane plus ou moins perméable aux différentes molécules, la membrane plasmique, qui joue le rôle de barrière entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire. Ces échanges de matière et d'information avec le milieu extracellulaire se font, pour la plupart grâce à des protéines intégrées à la membrane. C'est le cas par exemple des récepteurs qui permettent la transduction de signal. D'autres protéines membranaires telles que les canaux permettent le passage de molécules d'un compartiment cellulaire à un autre.

Les aquaporines sont de petites protéines transmembranaires permettant le passage sélectif et facilité de l'eau, du glycérol et de certains solutés non chargés à travers les membranes biologiques. Les aquaporines appartiennent à la grande famille «MIP» (Major Intrinsic Protein). Leur découverte a non seulement permis de comprendre comment l'eau traverse les membranes biologiques de manière rapide, spécifique et régulée mais a également apporté des explications physiopathologiques aux désordres du métabolisme de l'eau.

I. La perméabilité hydrique

Les membranes biologiques permettent la compartimentation et le maintien des milieux de compositions différentes de part et d'autre de celle-ci. Cette compartimentation existe aussi entre le cytosol et les organites (noyau, mitochondrie, chloroplaste...). Pour la plupart des molécules, la perméabilité d'une membrane lipidique diminue avec la masse moléculaire et augmente avec le caractère hydrophobe de la molécule considérée.

La perméabilité hydrique d'une membrane est définie par sa perméabilité diffusionnelle (P_d) et sa perméabilité osmotique (P_f) (Friedman, 2008). La perméabilité diffusionnelle correspond à la diffusion de molécules à travers une membrane en l'absence d'un gradient osmotique. La perméabilité osmotique correspond à la diffusion de molécules en présence d'un tel gradient. La perméabilité d'une membrane se mesure en nombre de molécules passant par unité de surface et de temps. On définit également l'énergie

d'activation (E_a) qui est l'énergie nécessaire au système pour faire passer une molécule à travers la membrane. Elle est déterminée par la loi d'Arrhenius $P_f = F * [e^{-(E_a/RT)}]$. Plus une membrane est imperméable, plus l'énergie d'activation nécessaire pour la traverser est élevée.

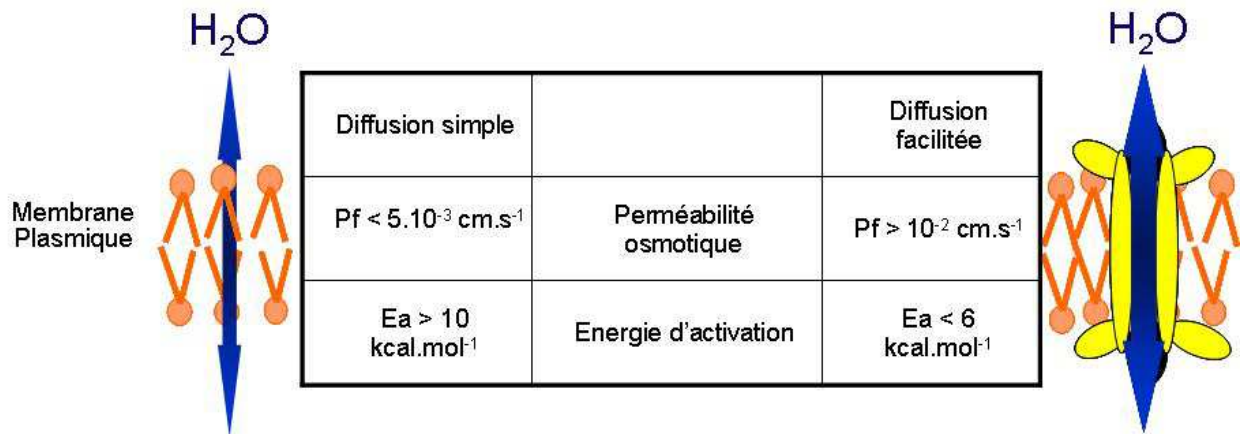


Figure A. I. 1. Définition d'un canal hydrique. Un canal hydrique permet le transport passif et facilité de l'eau à travers les membranes biologiques (diffusion facilitée).

Prenons le cas de la membrane plasmique qui délimite les cellules. Sa perméabilité osmotique à l'eau est faible ($< 5 \cdot 10^{-3} \text{ cm.s}^{-1}$) et l'énergie d'activation du passage de l'eau est élevée ($> 10 \text{ kcal.mol}^{-1}$), (figure A. I. 1).

Considérons maintenant la présence d'un canal au sein de la membrane plasmique. En présence d'un gradient osmotique le nombre de molécules passant à travers la membrane augmente ($P_f > 10^{-2} \text{ cm.s}^{-1}$) et le coût énergétique diminue ($E_a < 6 \text{ kcal.mol}^{-1}$). On parle alors de diffusion facilitée (figure A. I. 1). Il a longtemps été considéré que le passage de l'eau à travers la membrane plasmique s'effectuait selon le modèle de la diffusion simple.

Au milieu du 19^{ème} Siècle, l'idée de canaux permettant le passage de l'eau et de petits solutés au travers des cellules ou à travers des tissus (au niveau de la vessie par exemple) a été émise par Brücke en 1843, puis Pfeffer en 1877 et enfin Oswald en 1890 (Von Heijne, 2003). Cependant, il faudra attendre 1957 pour que le canal permettant ce passage commence à être caractérisé.

II. La découverte: L'Aquaporine 1

Les travaux menés par Solomon en 1960 montrent que l'eau est transportée à travers la membrane des globules rouges de manière rapide et sélective (Goldstein and Solomon 1960). Ces canaux peuvent être fermés par des dérivés mercuriels et excluent les ions, comme H_3O^+ et les petits solutés. Au cours de leurs travaux, Peter Agre et son équipe isolent en 1988 une petite protéine membranaire de 28 kDa, fortement exprimée au niveau des érythrocytes (Denker, Smith et al. 1988). En 1991, ils caractérisent partiellement cette protéine, elle est alors nommée CHIP28 (Channel-like Integral membrane Protein of 28kDa). Sa fonction est définitivement établie en 1992 (Preston, Carroll et al. 1992; Zeidel, Ambudkar et al. 1992).

Pour établir la fonction de CHIP28, Preston et al ont injecté de l'ARNm codant pour CHIP28 dans des ovocytes de xénopes (Preston, Carroll et al. 1992). Les ovocytes ayant subi une injection expriment au niveau de leur membrane plasmique la protéine CHIP28. Plongés dans un milieu hypotonique, ces ovocytes se mettent alors à gonfler rapidement jusqu'à l'éclatement tandis que les ovocytes sans CHIP28 se dilatent peu (figure A. II. 1).

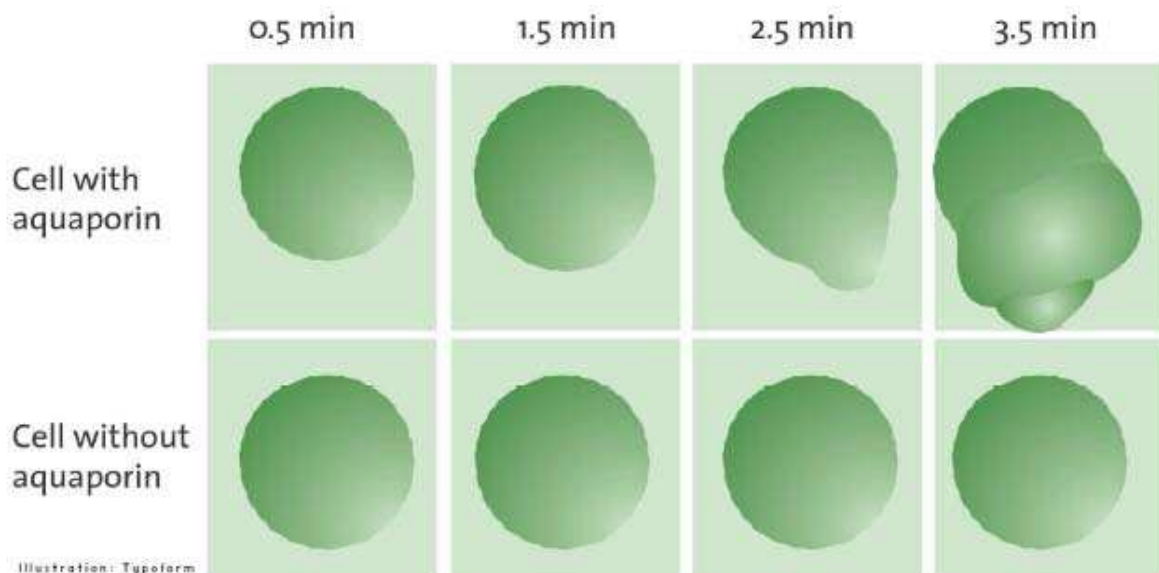


Figure A. II. 1. Expression fonctionnelle de l'AQP1 dans les ovocytes de xénopes. Von Heijne, 2003. Gonflement et éclatement des ovocytes exprimant l'AQP1 en milieu hypotonique alors que le volume des ovocytes normaux varie très peu.

Ce transport est inhibé par le mercure et l'inhibition est réversible (Preston, Jung et al. 1993). Des travaux réalisés avec les liposomes et les protéoliposomes contenant CHIP28 montrent des résultats similaires à ceux obtenus avec les ovocytes de xénopes (Zeidel, Ambudkar et al. 1992; Verbavatz, Brown et al. 1993; Zeidel, Nielsen et al. 1994). CHIP28 fut le premier canal hydrique caractérisé. De nombreux autres canaux hydriques furent découverts et CHIP28 fut renommée alors aquaporine 1 (AQP1).

III. La famille des aquaporines

A ce jour, plus de 450 protéines de la famille MIP, présentant de fortes homologies de séquences ont été découvertes chez des organismes tels que la bactérie, la levure, les insectes, les plantes et les animaux. Dans cette famille, les AQPs sont des facilitateurs d'eau et les GLPs sont des facilitateurs de glycérol (figure A. III. 1). Treize aquaporines ont été identifiées chez l'homme et sont numérotées d'AQP0 à AQP12. Les AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 et AQP8 sont dites aquaporines strictes c'est - à - dire uniquement perméable à l'eau. Les AQP3, AQP7, AQP9 et AQP10 sont des aquaglycéroporines qui permettent le passage sélectif de l'eau et du glycérol.

Les AQP11 et AQP12, récemment découvertes sont classées pour l'instant dans le groupe des aquaporines subcellulaires (Ishibashi 2006). On ne connaît pas encore leur véritable fonction.

		Distribution tissulaire des aquaporines chez les mammifères
Aquaporines strictes	AQP0	Œil
	AQP1	Cerveau, cœur, glandes lacrymales et salivaires, globules rouges, muscle squelettique, poumons, rein, peau
	AQP2	Rein
	AQP4	Cerveau, colon, muscle squelettique, poumons, rein
	AQP5	Glandes lacrymales et salivaires, œil, poumons
	AQP6	Rein
	AQP8	Cerveau, cœur, foie, glandes lacrymales et salivaires, intestin, pancréas
Aquaglycéroporines	AQP3	Colon, estomac, foie, globules rouges, intestin, œil, pancréas, poumons, rein, testicules, vessie, peau
	AQP7	Cœur, colon, intestin, muscle squelettique, rein, testicules, tissu adipeux
	AQP9	Cerveau, cœur, foie, intestin, poumons, rein, testicules, tissu adipeux, peau
	AQP10	Intestin, peau

Tableau résumant la distribution tissulaire des aquaporines de mammifères.

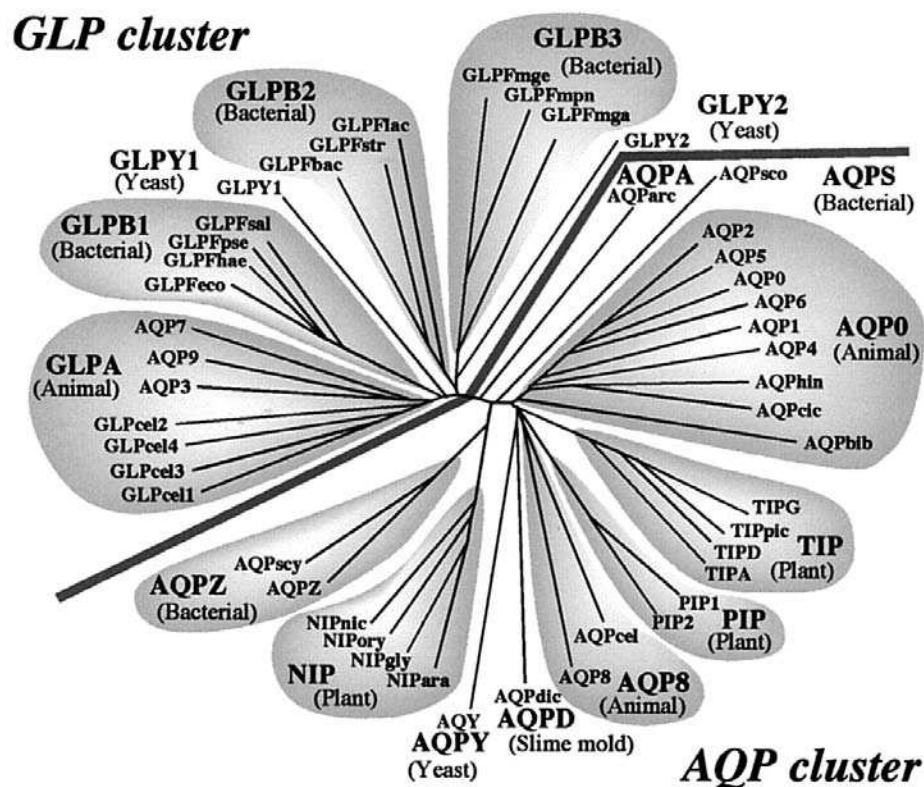


Figure A. III. 1. Classification phylogénétique des aquaporines. . D'après (Heymann and Engel 1999). GLP cluster : groupe des aquaglycéroporines et des transporteurs de glycérol, AQP cluster : groupe des transporteurs d'eau.

IV. La structure

La structure des aquaporines est composée de six segments transmembranaires en hélices α résultant de la duplication d'un gène ancestral. Ces segments sont constitués de deux homéodomaines de 3 hélices α transmembranaires, de deux boucles B (intracellulaire) et E (extracellulaire) et d'un motif NPA (Asparagine, Proline et Alanine), très conservé, caractéristique majeure des aquaporines (figure A. IV. 1).

L'importance et l'implication de certains acides aminés dans le passage de l'eau ont été mises en évidence par des expériences de mutagenèse dirigée. Il ressort de ces expériences

que les deux motifs NPA sont responsables de la sélectivité du canal. Tandis que la cystéine 189, proche du motif NPA de la boucle E, est impliquée dans la sensibilité au mercure (Preston, Jung et al. 1993; Zhang, van Hoek et al. 1993). En 1994, un modèle topologique de l'AQP1 appelé « modèle en sablier » est élaboré (Jung, Preston et al. 1994). Dans ce modèle, les boucles B et E, distantes l'une de l'autre dans la séquence primaire de la protéine se replient dans la membrane et se retrouvent physiquement associées pour former le pore (canal hydrique) dans la structure tertiaire de la protéine (figure A. IV. 2). Les molécules d'eau transitent en file indienne à la manière de grains de sable dans un sablier.

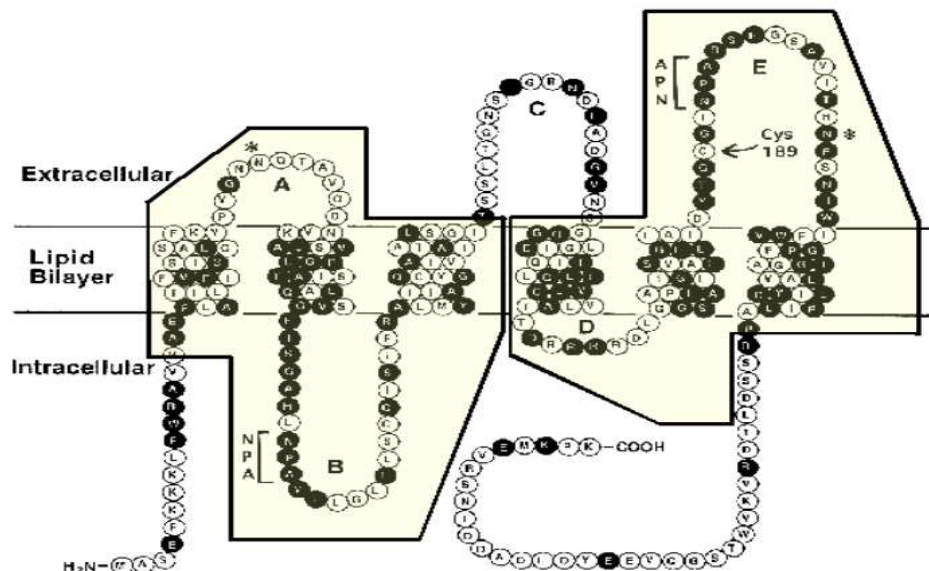


Figure A. IV. 1. Structure secondaire de l'aquaporine 1. (Preston and Agre 1991). NPA, séquence consensus responsable du passage de l'eau. La cystéine 189 au niveau de la boucle E est le site d'inhibition par le mercure. (*), les asparagines N42 et N205 sont des sites de glycosylation au niveau des boucles A et E.

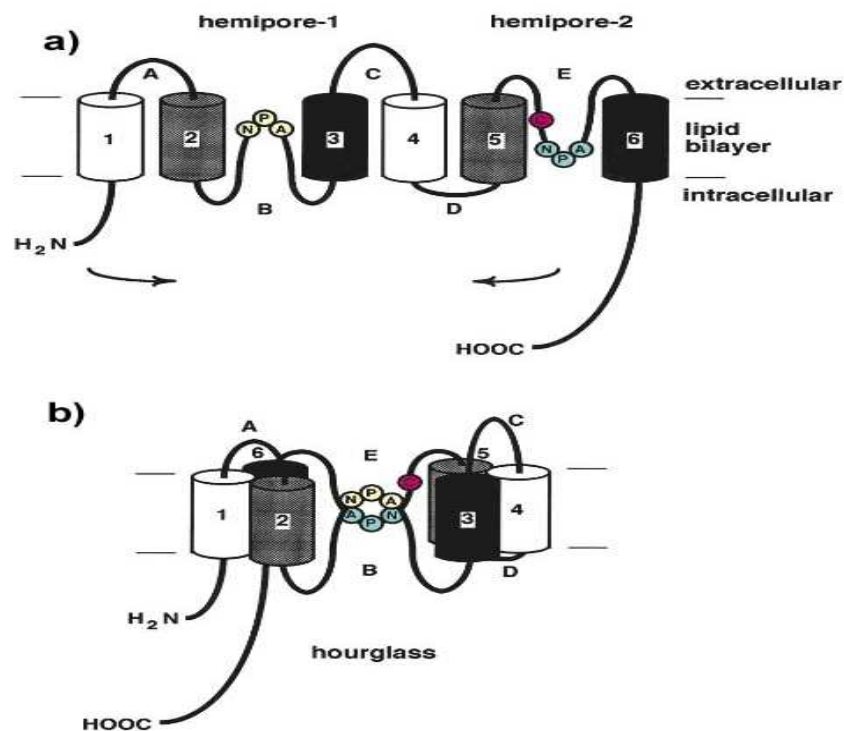


Figure A. IV. 2. Représentation topologique de l'AQP1 et modèle en forme de sablier.
Jung et al, 1994.

Ce modèle de l'AQP1 est confirmé plus tard par des études cristallographiques (Murata, Mitsuoka et al. 2000; de Groot, Engel et al. 2003; de Groot, Frigato et al. 2003). Ces études ont permis d'obtenir la structure tridimensionnelle à haute résolution de l'AQP1 (figure A. IV. 3). Les aquaporines peuvent être glycosylées et peuvent s'oligomériser. L'AQP1 forme des tétramères dans lesquels chaque monomère est fonctionnel et indépendant (Verbavatz, Brown et al. 1993; Jung, Preston et al. 1994; Zeidel, Nielsen et al. 1994). La tétramérisation de la protéine AQP1 permettrait de stabiliser la structure secondaire de chaque monomère (Moller, Fotiadis et al. 2003).

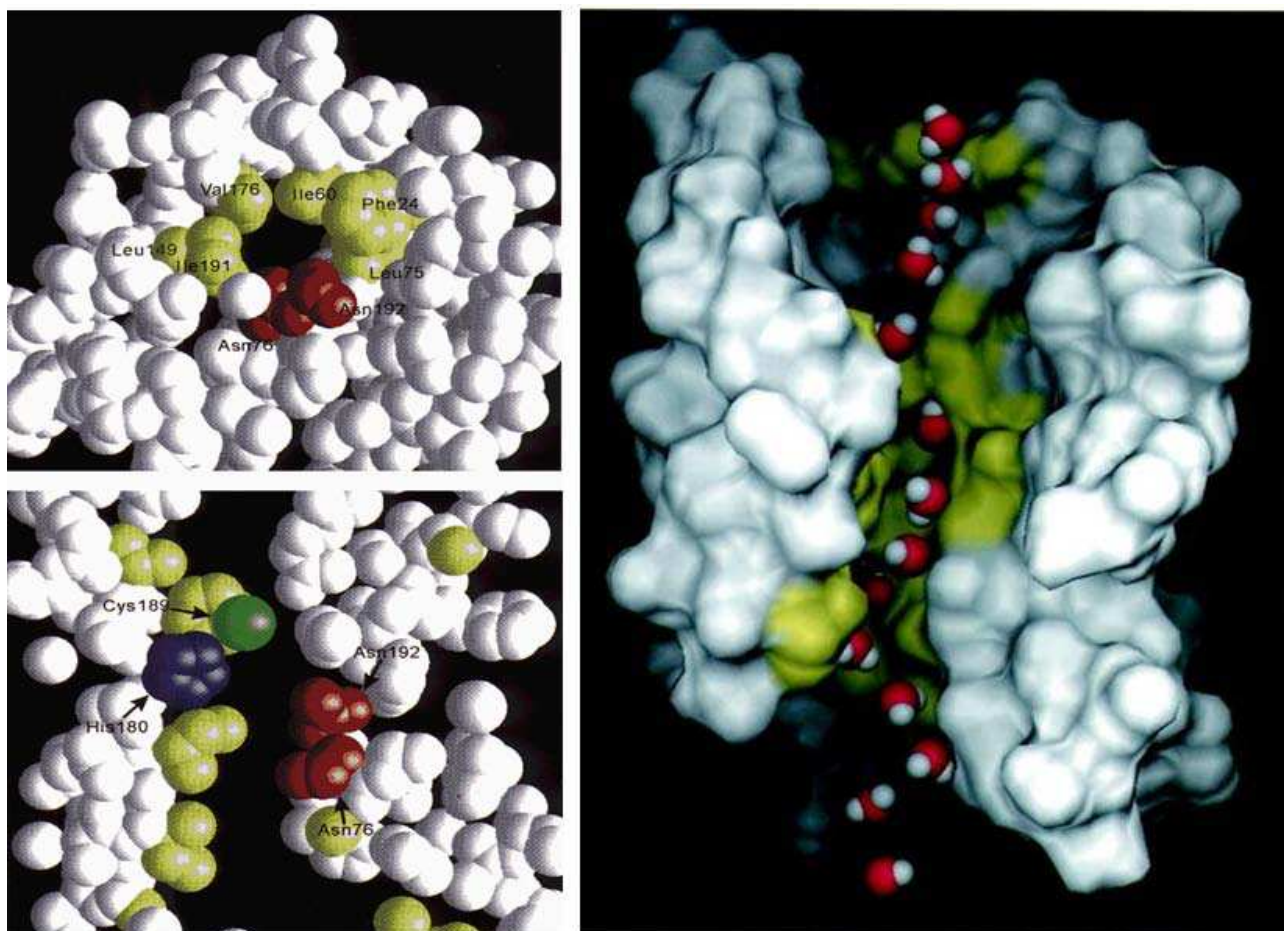


Figure A.IV.3. Modélisation d'un canal hydrique. D'après (Murata, Mitsuoka et al. 2000; de Groot and Grubmuller 2001). En jaune, résidus hydrophobes permettant le passage rapide de l'eau ; en rouge, asparagines des séquences NPA ; en vert, le site d'inhibition au mercure au niveau de la cystéine 189 et en bleu, l'histidine 180 est le résidu qui empêche le passage de molécules trop grosses.

V. Fonctions des aquaporines

La distribution tissulaire des aquaporines, les études de leur régulation ainsi que la génération des souris invalidées pour les gènes des aquaporines ont permis de connaître les multiples rôles qu'elles jouent dans les processus physiologiques.

Nous verrons d'abord le transport de l'eau via les aquaporines strictes principalement au niveau du rein, puis le transport du glycérol et le métabolisme des lipides via les

aquaglycéroporines et enfin nous verrons que certaines aquaporines sont impliquées dans d'autres fonctions.

VI. 1. Aquaporines et transport d'eau

Le rein est un organe vital constitué d'environ un million de néphrons. Plusieurs aquaporines et aquaglycéroporines sont exprimées au niveau du rein (figure A. V. 1). Leur découverte a permis de comprendre la physiologie rénale mais également les pathologies qui y sont associées.

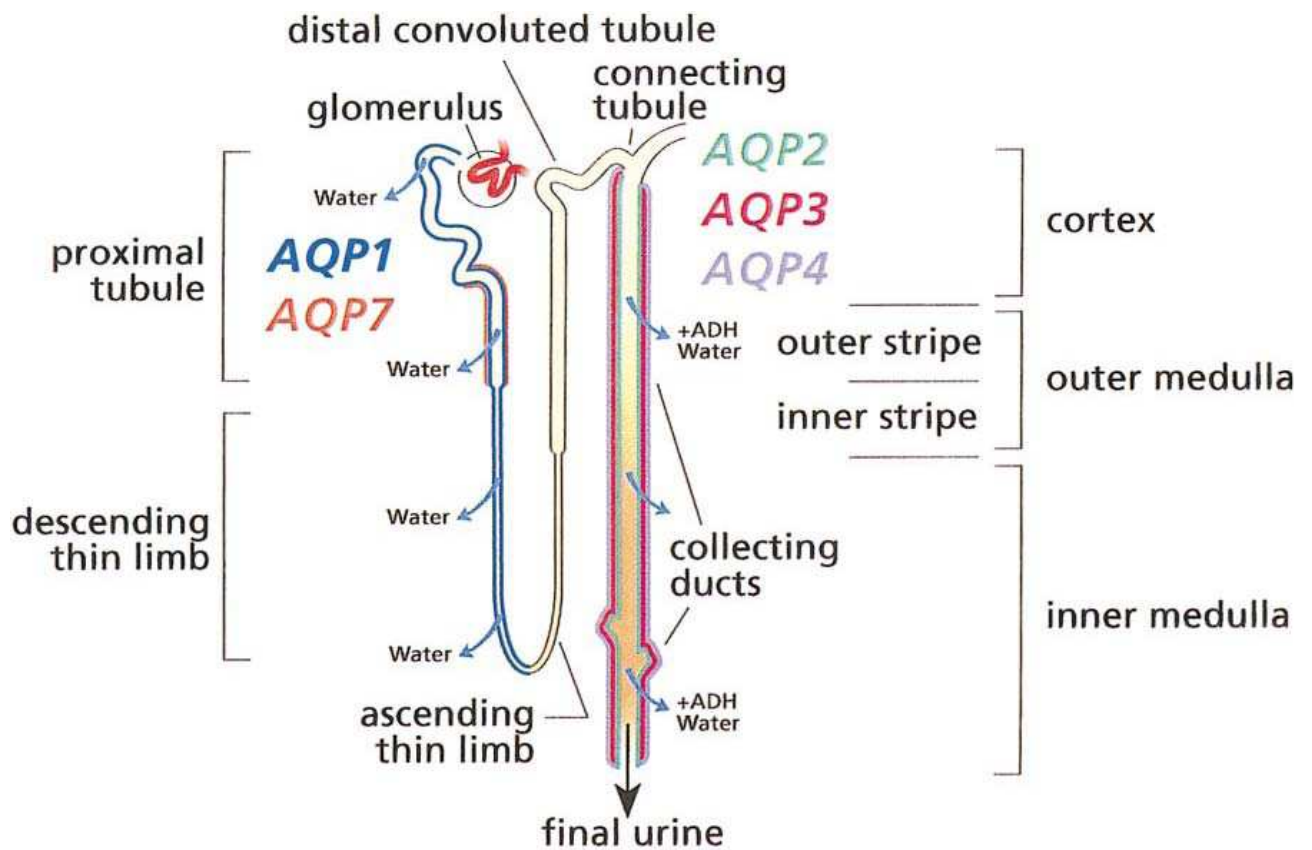


Figure A. V. 1. Localisation des aquaporines rénales. Nielsen 2002

L'aquaporine 1

Au niveau rénal, l'AQP1 est exprimée de façon constitutive dans les cellules épithéliales du tube proximal, à la membrane plasmique apicale des bordures en brosse ainsi qu'à la membrane plasmique basolatérale. Elle confère à cette partie du néphron une grande perméabilité hydrique, responsable de la réabsorption de l'eau filtrée au niveau du glomérule. Elle est également présente dans la partie descendante de l'anse de Henle (Sabolic, Valenti et al. 1992; Nielsen, Smith et al. 1993; Maunsbach, Marples et al. 1997) et dans les épithéliums vasa et recta descendants (Pallone, Kishore et al. 1997) où elle constitue le lieu de passage d'une grande quantité d'eau depuis la lumière tubulaire jusqu'à l'interstitium et dans l'espace vasculaire.

L'aquaporine 2

L'aquaporine 2 est localisée dans le rein, au pôle apical des cellules principales du canal collecteur où s'effectue la réabsorption de l'eau régulée par l'hormone antidiurétique (Nielsen, Smith et al. 1993; Nielsen, Frokiaer et al. 2002; Takata, Matsuzaki et al. 2004; Morishita, Matsuzaki et al. 2005). En absence d'hormone antidiurétique, l'aquaporine 2 est internalisée par endocytose, ce qui restaure la perméabilité de base du canal collecteur.

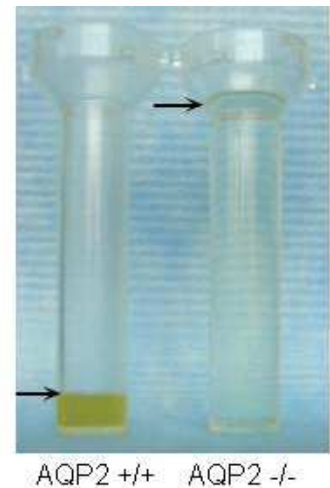
Des études ont montré que l'AQP2 est l'une des causes (formes héréditaires et états acquis) du diabète insipide néphrogénique (NDI) (Deen, Verdijk et al. 1994; Nielsen, Frokiaer et al. 2002). Cette pathologie est due à une mutation qui code pour une AQP2 non fonctionnelle. D'autres mutations, en empêchant l'activation du récepteur V_2 de la vasopressine ou le trafic de l'AQP2 aboutissent à des pathologies de type NDI (figure A.V. 2).

K.O. AQP1 : Défaut de concentration urinaire

K.O. AQP2 : Diabète néphrogénique insipide

K.O. AQP3 : Polyurie sévère

K.O. AQP4 : Défaut de concentration urinaire



a

b

Figure A. V. 2. Troubles urinaires associés aux aquaporines rénales. Nejsun, 2005. (a) Dysfonctionnement de la concentration urinaire du à l'absence des AQP1, AQP2, AQP2 et AQP4. (b) Comparaison des urines recueillies en 24h chez des individus exprimant ou non l'AQP2.

La translocation de l'AQP2 des vésicules intracellulaires à la membrane plasmique apicale est dépendante de l'activation du récepteur V_2 à la vasopressine (figure A.V. 3).

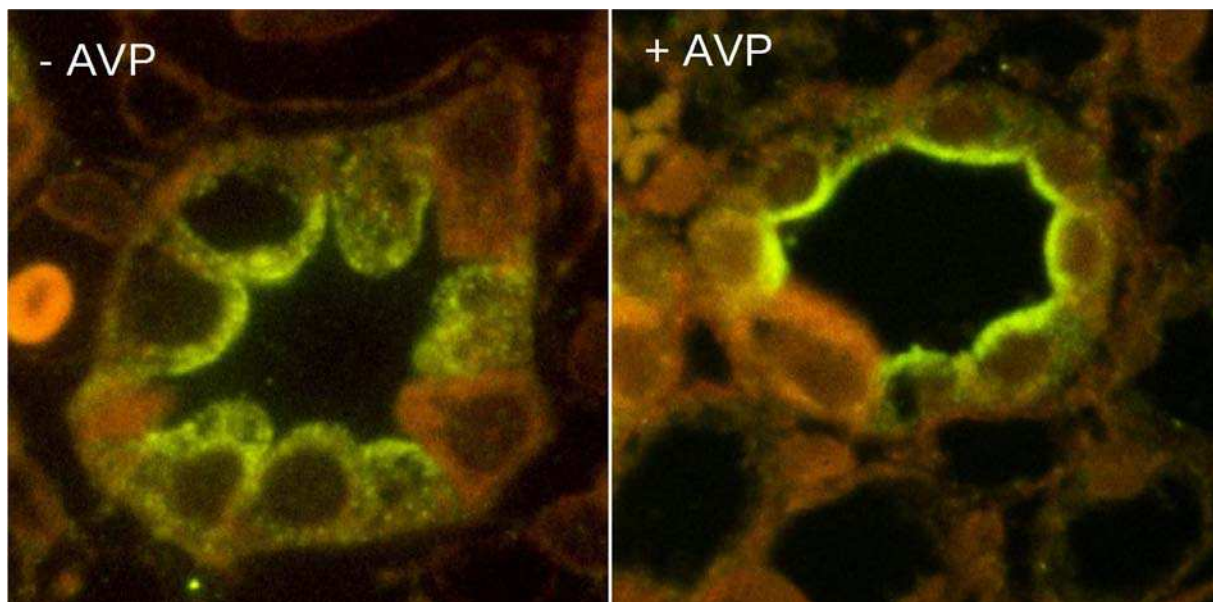


Figure A.V. 3. Localisation de l'AQP2 avant et après traitement par la vasopressine. D'après (Sabolic, Katsura et al. 1995). (gauche) localisation intracellulaire, (droit) localisation à la membrane apicale.

L'activation du récepteur V_2 par la vasopressine entraîne une cascade d'évènements. L'adénylate cyclase est activée et génère de l'AMP cyclique, la protéine kinase A (PKA) est alors activée. La PKA est recrutée au niveau des vésicules intracellulaires contenant l'aquaporine 2. L'AQP2 associée en tétramère est phosphorylée au niveau de la sérine 256 par la PKA. Trois monomères doivent être phosphorylés pour permettre la translocation à la membrane plasmique apicale (Kamsteeg et al, 2000). Dès fusion des vésicules, la perméabilité hydrique de la membrane apicale augmente. L'eau est alors réabsorbée de la lumière du tube collecteur à travers les cellules via l'AQP2 à la membrane apicale et ressort via l'AQP3 et l'AQP4 localisées à la membrane basale de ces cellules (figure A. V. 4).

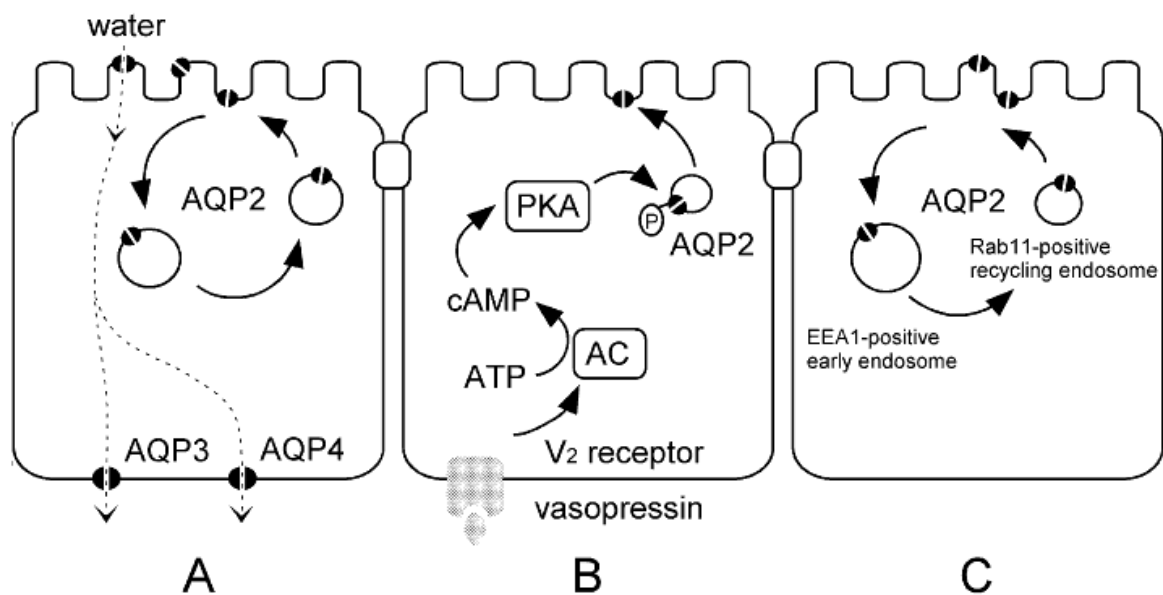


Figure A. V. 4. Schéma montrant le trafic de l'AQP2. De Takata et al, 2004. (A) Lorsque l'AQP2 est transloquée à la membrane plasmique, il s'en suit un transport d'eau via l'AQP2 à la membrane plasmique apicale et via l'AQP3 et l'AQP4 à la membrane plasmique basolatérale. (B) La fixation de la vasopressine à son récepteur V_2 entraîne l'activation de l'adénylate cyclase (AC) et de la protéine kinase A (PKA). Il en résulte une phosphorylation de l'AQP2 et sa translocation à la membrane plasmique. (C) Fin de la stimulation à la vasopressine. Endocytose de l'AQP2 au niveau des endosomes.

Dès l'arrêt de la stimulation par la vasopressine, l'aquaporine 2 est internalisée de manière clathrine-dépendante (Brown 2003). Elle est alors recyclée ou dégradée au niveau du

lysosome ou éliminée via les urines (Kamsteeg, Hendriks et al. 2006). De fait, l'adressage de l'AQP2 constitue un bon marqueur de l'action de la vasopressine au niveau rénal. L'aquaporine 2 est la seule pour laquelle une régulation à court terme est connue. Elle est également régulée sur le long terme par la vasopressine qui induit sa surexpression.

L'aquaporine 3

Au niveau rénal, l'aquaglycéroporine AQP3 est localisée au niveau de la membrane basolatérale des canaux collecteurs. Elle permet de manière conjointe avec l'AQP2, le passage transcellulaire de l'eau depuis la lumière tubulaire jusqu'à l'interstitium. Sa distribution membranaire est indépendante de l'hormone antidiurétique mais son expression augmente au cours d'une déshydratation prolongée (Ecelbarger, Terris et al. 1995)

L'aquaporine 4

Dans le rein, l'AQP4 est exprimée à la membrane basolatérale des cellules principales du canal collecteur de la médulla interne. Tout comme l'AQP3, l'AQP4, participerait à la sortie de l'eau des cellules épithéliales, mais sa régulation semble différer de celle de l'AQP3. Par opposition aux autres aquaporines, la perméabilité hydrique de l'AQP4 n'est pas sensible au mercure (Ma, Yang et al. 1998).

V. 2. Aquaporines et transport du glycérol

L'implication des aquaglycéroporines dans le transport et le métabolisme du glycérol a été découverte récemment (Hibuse, Maeda et al. 2006; Rojek, Praetorius et al. 2008).

L'AQP7, autrefois appelée AQPap, a été clonée à partir des tissus adipeux humains (Kuriyama, Kawamoto et al. 1997). Les adipocytes blancs stockent la graisse sous forme de triglycérides (lipogenèse) constituant ainsi un réservoir énergétique. Lors de la lipogenèse, l'insuline active le transfert du transporteur de glucose 4 (GLUT4) à la membrane plasmique qui permet l'entrée du glucose dans les adipocytes. Le glucose intracellulaire est alors transformé en glycérol-3-phosphate. L'insuline active également les lipoprotéines lipases synthétisées par les adipocytes et présentes à la surface des cellules endothéliales. Ces lipases activées captent et dégradent en acides gras libres les transporteurs d'acides gras (chylomicron

et VLDL) présents dans le sang, permettant ainsi leur absorption par le tissu adipeux. Le glycérol-3-phosphate et les acides gras libres sont estérifiés en triglycérides et stockés.

Il a été également montré que le transport du glycérol au niveau des adipocytes est un nouveau régulateur dans le processus d'accumulation de la graisse (Hara-Chikuma, Sohara et al. 2005). Son implication dans l'obésité a aussi, été étudié (figure A.V.5) (Hibuse, Maeda et al. 2005).

De nombreuses études menées tant chez l'animal que chez l'homme ont montré l'implication de l'AQP7 dans le métabolisme des lipides (Kishida, Kuriyama et al. 2000). L'AQP7 est responsable de la libération du glycérol des adipocytes vers le sang. Ainsi l'expression de l'AQP7 augmente à jeun en parallèle à l'augmentation de la concentration plasmatique en glycérol, mais à l'opposé de la concentration en insuline (Rodriguez, Catalan et al. 2006). A la suite d'un repas, le taux d'insuline plasmatique augmente. Par contre, le taux de glycérol diminue de même que l'expression de l'AQP7 dans les adipocytes. L'expression de l'AQP7 serait donc régulée de manière négative sur le long terme par l'insuline. L'invalidation du gène de l'AQP7 empêche la sortie du glycérol et induit l'hypertrophie des adipocytes (figure A.V.5) (Maeda, Funahashi et al. 2004; Hara-Chikuma, Sohara et al. 2005; Hibuse, Maeda et al. 2005; Prudente, Flex et al. 2007). La mutation du gène de l'AQP7 chez un individu conduit à la synthèse d'une protéine AQP7 moins perméable à l'eau et au glycérol (Kondo, Shimomura et al. 2002). Cet individu ne présente aucun phénotype d'obésité ou d'hypertrophie des adipocytes. Néanmoins, au cours d'une épreuve physique, il ne peut pas augmenter son taux de glycérol alors que son taux de catécholamine augmente. L'AQP7 est donc nécessaire au maintien du taux de glycérol plasmatique.

L'AQP7 est également présente dans la bordure en brosse des cellules épithéliales de la dernière partie S3 du tube proximal (Ishibashi, Imai et al. 2000).

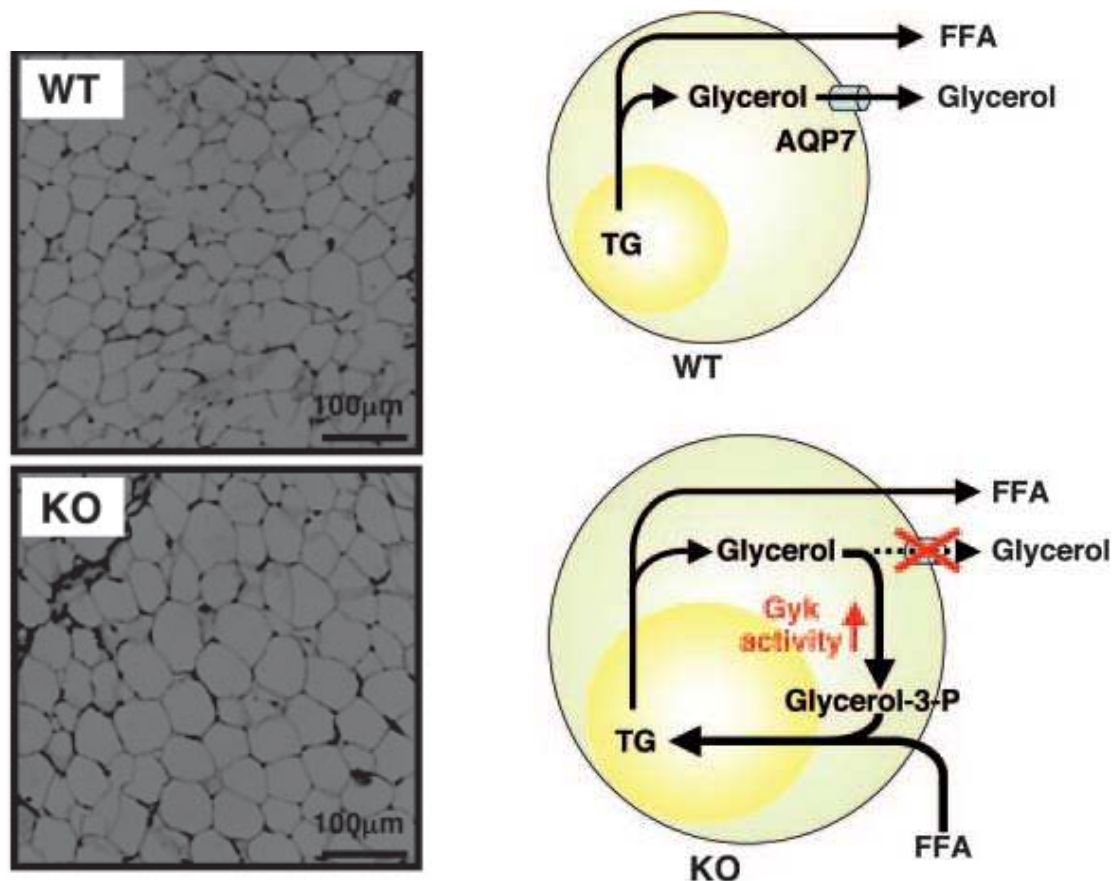


Figure A.V.5. L'AQP7 dans les adipocytes et voie de sortie du glycérol. Hibuse et al, 2005. (gauche) Des adipocytes invalidés pour le gène AQP7 apparaissent hypertrophiés. (droit), le glycérol retenu dans les adipocytes AQP7 $-/-$ retourne dans la voie de synthèse des triglycérides conduisant à l'hypertrophie des adipocytes.

Outre, l'AQP7, l'AQP9 est également impliquée dans le métabolisme du glycérol. L'AQP9, localisée au niveau du foie, intervient dans l'absorption du glycérol (Nihei, Koyama et al. 2001; Carbrey, Gorelick-Feldman et al. 2003). Chez un individu à jeun, l'expression de l'AQP9 augmente de même manière que la glycérol kinase impliquée dans la première étape de la néoglucogenèse. Tandis qu'à satiété, l'expression de l'AQP9 diminue et la néoglucogenèse semble être stoppée (figure A.V.6).

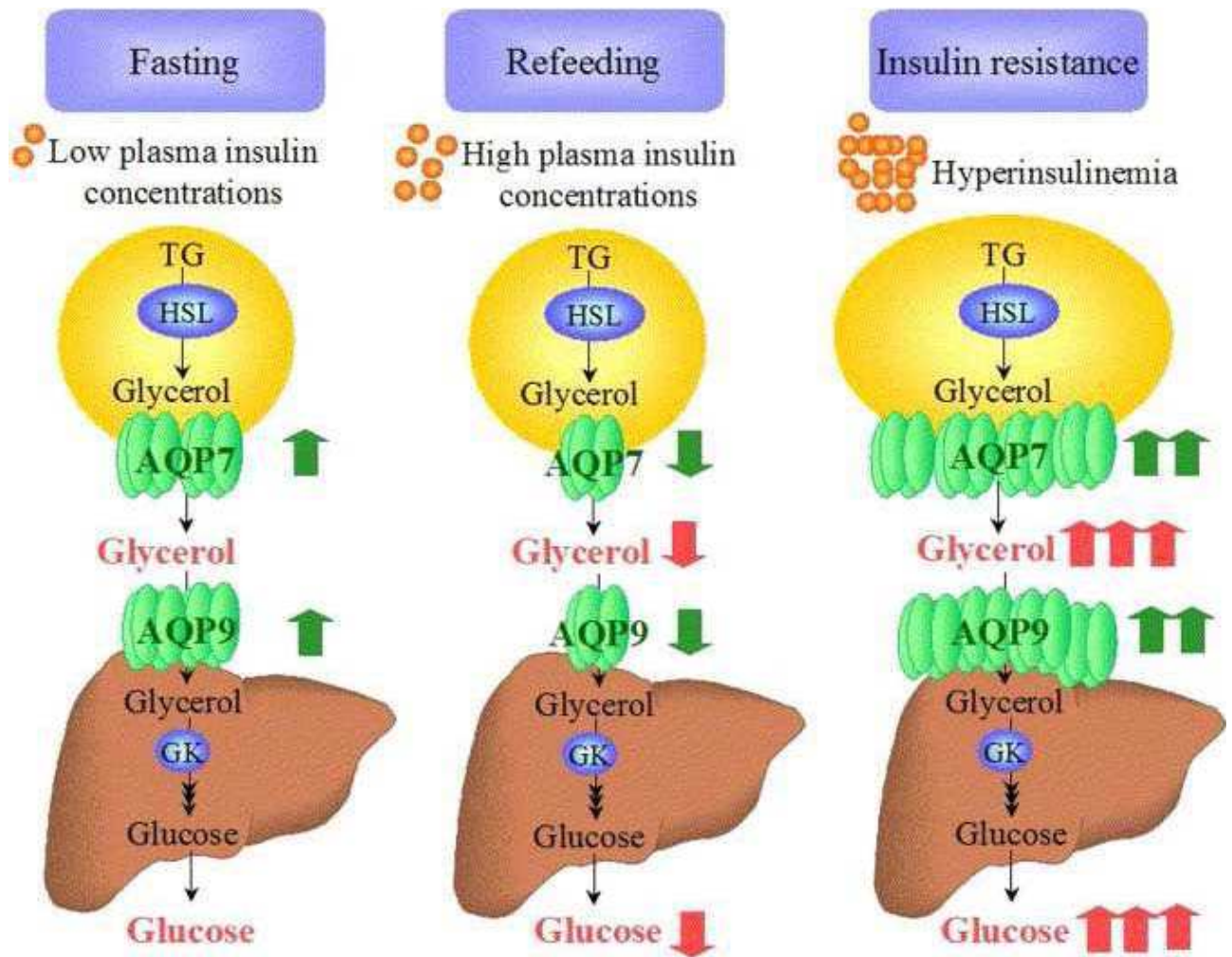


Figure A. V. 6. Implication des AQPs 7 et 9 dans le métabolisme du glycérol. (Rodriguez, Catalan et al. 2006). En période de jeûne (fasting), à satiété (refeeding) et pour un diabète de type II (insulin resistance).

V. 3. Autres fonctions des aquaporines

L'AQP0 appelée autrefois MIP26, a été isolée et clonée avant l'AQP1 (Gorin, Yancey et al. 1984; Pisano and Chepelinsky 1991). Elle représente plus de 60% des protéines membranaires du cristallin, sa fonction de canal hydrique a été découverte en 1995 (Mulders, Preston et al. 1995). MIP26 fut renommée AQP0 pour souligner l'antériorité de sa découverte. Cette aquaporine s'organise au sein des membranes en larges réseaux orthogonaux (figure A. V. 7). Elle intervient dans le transport de l'eau et le maintien de la transparence du cristallin. Son expression serait corrélée avec la rétention d'eau dans le cristallin (Shiels, Bassnett et al.

2001). L'AQP0 a également une fonction complètement différente. L'AQP 0 est clivée dans les fibres du cristallin selon un mécanisme dépendant de l'âge. Avec l'âge, ces fibres s'enfoncent vers l'intérieur du cristallin, l'AQP0 est alors majoritairement clivée, ce qui conduit à la cataracte. Des mutations de l'AQP0 sont d'ailleurs responsables des cataractes congénitales.

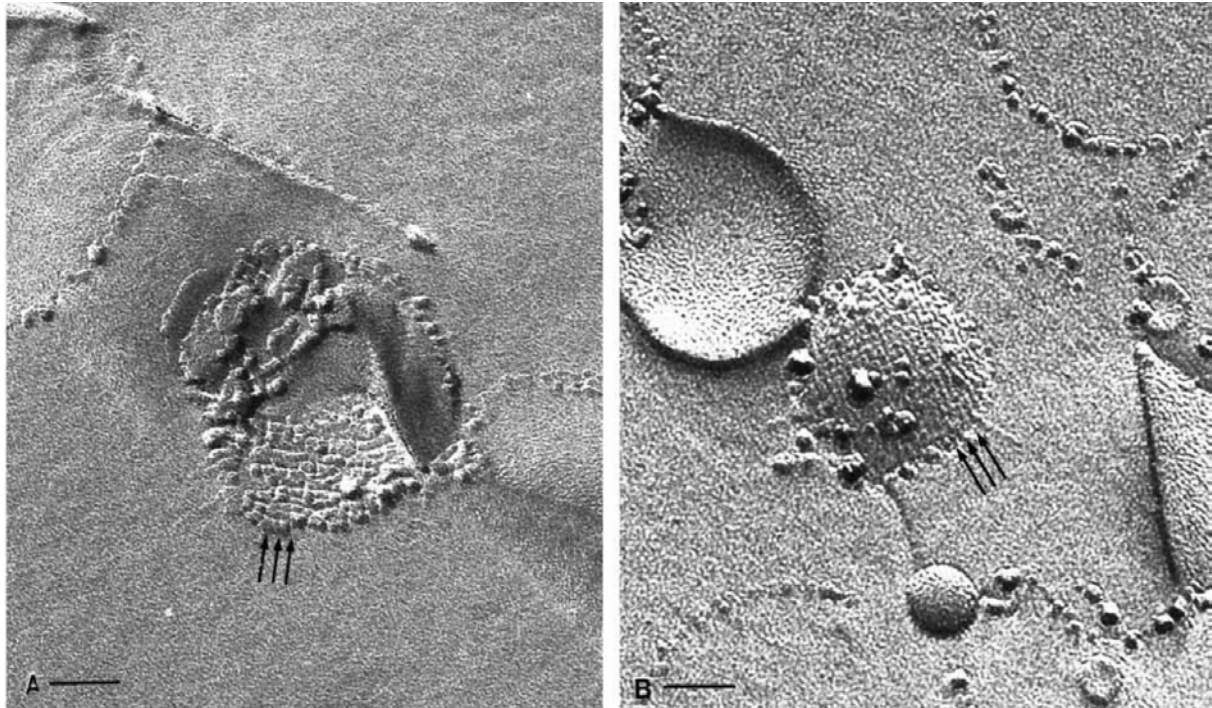


Figure A.V.7. Réseaux orthogonaux de MIP26 dans les protéoliposomes. (Verbavatz, Van Hoek et al. 1994). Observation en microscopie électronique après cryofracture.

B. LA PEAU HUMAINE

La peau est un organe de revêtement souple, recouvrant toute la surface du corps. Chez un adulte, elle fait environ 2 m² et représente approximativement 6% du poids corporel soit 5 à 6 kg (Tobin 2006). Elle est l'organe du toucher, deuxième sens après la vue en termes d'informations traitées par le cerveau (Boulais and Misery 2008).

La peau assure une protection mécanique contre les traumatismes et la pénétration des germes nocifs, une protection contre la lumière solaire par son système mélanique. C'est aussi l'organe périphérique de thermorégulation.

La peau est constituée de trois couches superposées (Freinkel et al, 2001 et McGrath et al, 2008). On distingue du bas vers le haut:

L'hypoderme, c'est la couche la plus profonde. Elle est aussi appelée tissu adipeux sous cutané. Au dessus de l'hypoderme, se trouve le derme. C'est un tissu conjonctif extrêmement vascularisé et innervé qui mesure 2 à 4mm d'épaisseur. Enfin, la couche la plus superficielle, l'épiderme a une épaisseur comprise entre 75 et 150µm.

La peau est un organe très complexe dont la structure varie avec l'âge, le sexe et l'exposition solaire.

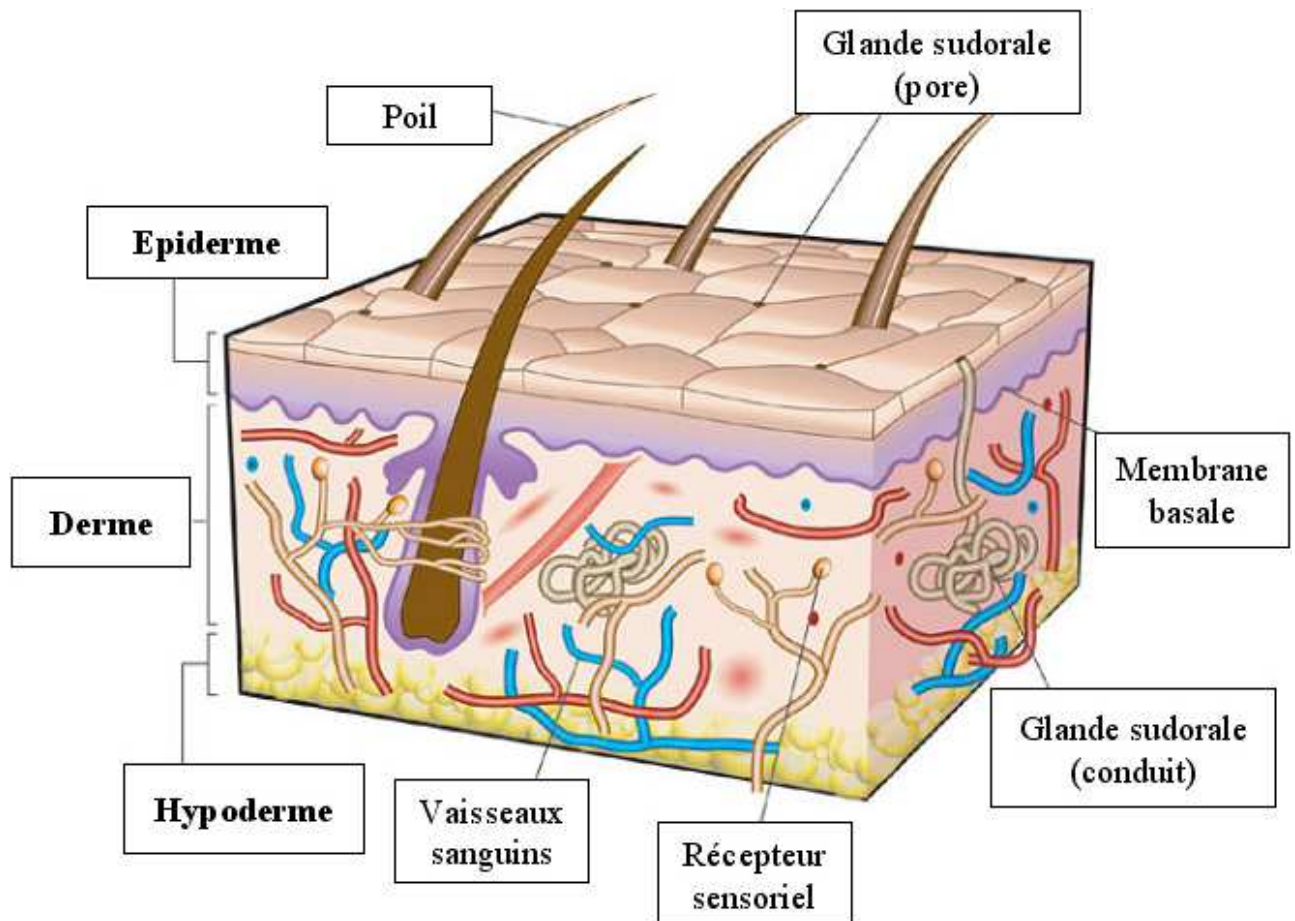


Figure B. I.1. Représentation schématique de la peau. D'après (MacNeil 2007).

I. L'hypoderme

L'hypoderme, est en interaction fonctionnelle avec la peau et lui permet ainsi d'assurer certaines de ses fonctions de protection. L'hypoderme est constitué de septa conjonctifs qui cloisonnent les lobes adipeux. Les cellules adipeuses ou adipocytes sont riches en acides gras et en triglycérides, elles servent de réserves énergétiques mais jouent également un rôle de protection mécanique et thermique.

On trouve dans l'hypoderme, des fibroblastes, des macrophages, des vaisseaux sanguins et des terminaisons nerveuses. Ces dernières sont aussi appelées corpuscules de Pacini ou lamellaires et sont sensibles à la pression (Freinkel et al, 2001 et McGrath et al, 2008).

II. Le derme

Le derme est un tissu conjonctif dense, compressible et élastique. Le derme assure des fonctions métaboliques importantes. Outre son rôle nutritif pour l'épiderme, le derme est aussi impliqué dans la cicatrisation ainsi que dans l'élimination de produits toxiques. Il renferme également le système vasculaire de la peau et joue un rôle dans la thermorégulation. Chez l'homme, le derme est constitué de deux parties: le derme superficiel ou papillaire et le derme réticulaire (Freinkel et al, 2001 et McGrath et al, 2008).

Le derme superficiel ou papillaire, situé à la jonction dermo-épidermique, tient son nom de sa surface en papilles. Le derme papillaire est composé d'une substance fondamentale, (glycosaminoglycanes) et des structures fibrillaires conjonctivoélastiques lâches (fibrilles de collagène et fibres élastiques d'oxytalane). Il contient également les anses capillaires terminales et les terminaisons nerveuses.

Le derme réticulaire, constitue presque toute l'épaisseur du derme. Il est composé majoritairement de larges faisceaux de fibres de collagènes, intégrés à des fibres élastiques (élastine et élaunine). Le derme réticulaire est moins riche en cellules que le derme papillaire. Néanmoins, il renferme des corpuscules nerveux de la sensibilité tels que les corpuscules de Pacini ainsi qu'une riche vascularisation. On retrouve aussi au niveau du derme les glandes pilo-sébacées et des canaux excréteurs des glandes sudoripares. Il existe plusieurs types de cellules dans le derme :

Les fibroblastes: D'origine mésenchymateuse, ce sont les cellules majoritaires du derme. Ils synthétisent toutes les macromolécules de la matrice extracellulaire. Les fibroblastes jouent un rôle important dans le renouvellement des fibres de collagène et des fibres élastiques en synthétisant des enzymes qui les dégradent.

Les mastocytes: D'origine médullaire, se répartissent dans tout le derme. Ce sont des cellules granuleuses qui contiennent des médiateurs chimiques tels l'histamine, la sérotonine ou l'héparine. Les mastocytes initient puis amplifient la réaction inflammatoire cutanée lorsqu'ils sont en contact avec un allergène.

Les histiocytes: Également d'origine médullaire, ce sont des macrophages du tissu conjonctif qui interviennent dans la phagocytose (Freinkel et al, 2001 et McGrath et al, 2008).

III. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium pluristratifié en constant renouvellement. Il est constitué majoritairement de cellules épithéliales appelées kératinocytes en raison de leur synthèse de kératines. La kératine est une protéine fibreuse qui confère à l'épiderme sa dureté. Le renouvellement de l'épiderme est assuré par la prolifération des kératinocytes situés sur la lame basale sus-jacente au derme. Plus les kératinocytes progressent vers l'extérieur de l'organisme plus leur différenciation est avancée. Au terme de cette différenciation, les kératinocytes deviennent des cellules mortes, anucléées, appelées cornéocytes très riches en kératine.

L'état d'équilibre de l'épiderme dépend des processus de prolifération et de différenciation des kératinocytes. Lorsque survient un dysfonctionnement au niveau de ce processus, la physiologie et la morphologie de l'épiderme sont modifiées. Ceci peut conduire par exemple au psoriasis dans lequel l'épiderme est en hyper-prolifération (Freinkel et al, 2001 et McGrath et al, 2008).

III. 1. Structure de l'épiderme

L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé. Il s'étend sur toute la surface du corps et se poursuit par les muqueuses, où il est non kératinisé. L'épiderme est dénué de vaisseaux sanguins. De la base vers la superficie, on distingue: le stratum germinativum, le stratum spinosum, le stratum granulosum et le stratum corneum (figure B. III .1).

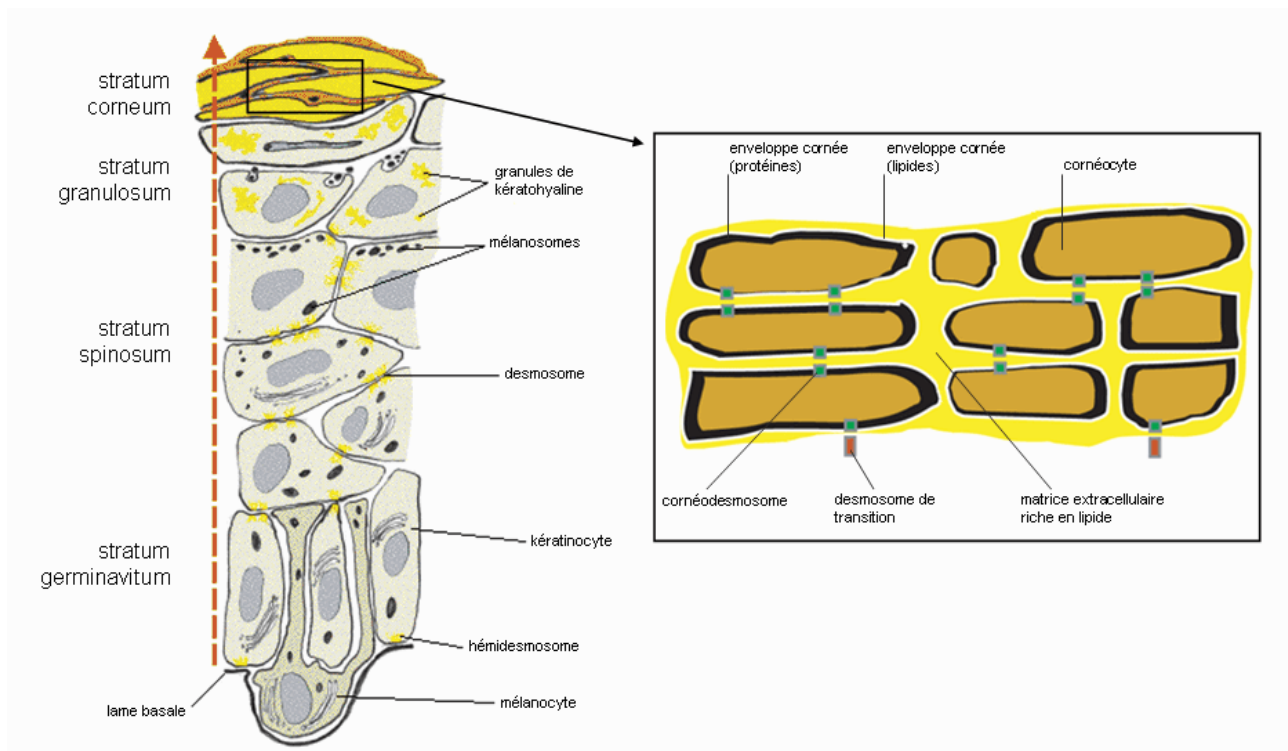


Figure B. III. 1. Structure de l'épiderme. Adapté de Gilbert, 2004 et de Proksch et al, 2008. Représentation schématique. (gauche) : de la lame basale à la couche cornée. (droit) « focus » sur la structure de type « brique et mortier » de la couche cornée.

III. 1. 1. Le stratum germinativum

Encore appelé, couche basale, il est accolé au derme et suit tous les contours de ses papilles. C'est la couche la plus profonde de l'épiderme. Cette strate est composée en majeure partie de cellules cubiques peu différenciées ayant une activité mitotique intense, les kératinocytes. Ils sont fixés entre eux par des desmosomes et à la lame basale par des hémidesmosomes. Le renouvellement constant de l'épiderme est assuré par la prolifération des kératinocytes au niveau de cette couche. On note également au niveau de cette couche la présence des cellules de Merkel et des mélanocytes.

Les cellules de Merkel ne sont rattachées ni aux kératinocytes ni à la lame basale. Ce sont des cellules de forme ovale. Elles sont disposées parallèlement à la surface cutanée et

projettent des expansions villositaires entre les kératinocytes adjacents, auxquels elles sont reliées par les desmosomes.

Les mélanocytes sont des cellules dendritiques de grandes tailles qui s'intercalent entre les kératinocytes de la lame basale (figure B. III. 2). Ils sont responsables de la pigmentation de la peau via la synthèse de mélanine. La mélanine est le pigment naturel de la peau qui lui confère une protection contre les rayonnements Ultra-violet (UV) notamment en protégeant l'ADN du stress oxydatif induit par les UV (Miyamura, Coelho et al. 2007). Les mélanocytes proviennent des mélanoblastes. Au cours du développement embryonnaire, les mélanoblastes se différencient et migrent de la crête neurale vers l'épiderme (Yamaguchi, Brenner et al. 2007). Les mélanocytes sont répartis de manière uniforme avec un ratio d'un mélanocyte pour environ dix kératinocytes basaux. Ce ratio est le même quelle que soit la couleur de la peau. Le processus de synthèse et de transfert de la mélanine dans l'épiderme porte le nom de mélanogénèse.

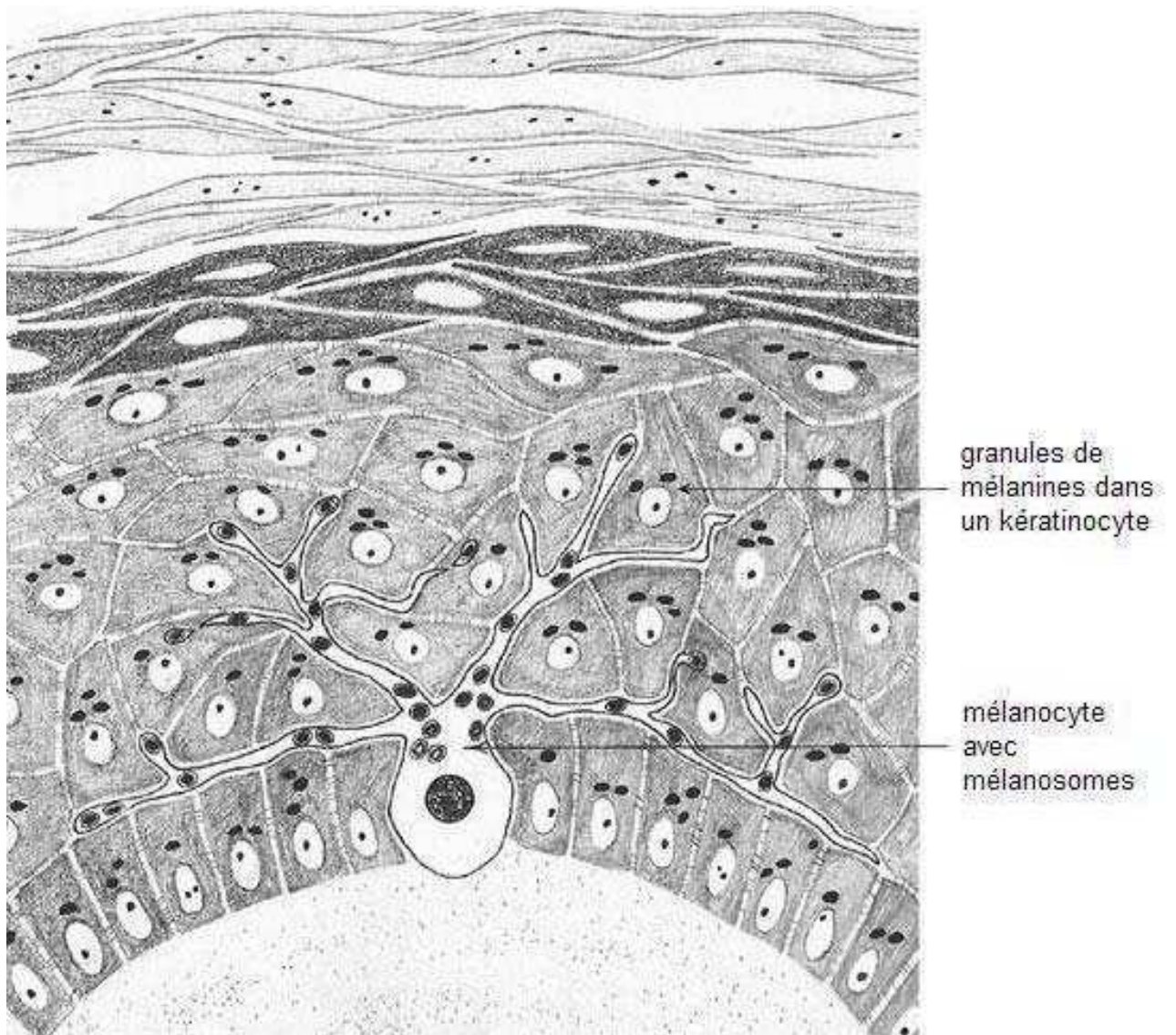


Figure B. III. 2. Représentation schématique d'un mélanocyte au sein de l'épiderme.

Adapté d'Ackerman et al 2002-2006

III. 1. 2. Le stratum spinosum

Le stratum spinosum ou couche épineuse est composé de huit à dix strates de kératinocytes liés entre eux et qui conservent une faible capacité à se diviser (figure B. III. 1). Au niveau de cette couche, les kératinocytes sont plus aplatis et plus étendus que dans la

couche basale. On retrouve entre les kératinocytes, les cellules de Langerhans qui sont des cellules du système immunitaire.

Les cellules de Langerhans possèdent de longs prolongements dendritiques et sont caractérisées par la présence d'organites en forme de « raquette de tennis », les granules de Birbeck. Les cellules de Langerhans ont une activité macrophagique, leur nombre augmente lors de désordres cutanés d'origine immunitaire. Ce sont les seules cellules capables de présenter un antigène au niveau des épithélia.

III. 1. 3. Le stratum granulosum

Au dessus du stratum spinosum se trouve le stratum granulosum ou couche granuleuse. Chez l'homme, il est composé de cinq à huit strates de kératinocytes (figure B.III.1). Les kératinocytes de cette couche sont caractérisés par la présence de grains de kératohyaline (précurseur de la kératine) et de corps lamellaires, appelés corps d'Odland ou kératinosomes (Young et al, 2000). Dans cette couche, les cellules s'aplatissent et se disposent parallèlement à la surface de la peau.

Les grains de kératohyalines sont des agrégats de protéines insolubles. En fonction des protéines qui les composent, on distingue deux populations qui ne sont pas délimitées par une membrane : les granules L et les granules F (Steven, Bisher et al. 1990).

Les granules L ont une forme ronde et une taille moyenne de 0,5µm. Ils sont composés de loridine, une protéine précurseur de l'enveloppe cornée.

Les granules F ont une forme irrégulière et une taille de 1,7µm. Ils sont composés de profilaggrine, précurseur de la filaggrine qui intervient dans l'aggrégation des filaments de kératines.

Les corps lamellaires sont de petits organites de 0,2- 0,3µm d'origine Golgienne. Leur empilement en lamelles leur confère cette appellation. Ces organites spécialisés sont préférentiellement composés de lipides neutres mais aussi de sphingolipides de types céramides et glucosylcéramides (Vielhaber, Pfeiffer et al. 2001).

III. 1. 4. Le stratum corneum

Le stratum corneum ou couche cornée est la couche superficielle de l'épiderme. Le facteur naturel d'hydratation ou NMF (Natural Moisturizing Factor) compose près d'un tiers de cette couche. C'est un ensemble de substances qui ont une forte affinité pour l'eau et permettent donc une bonne hydratation de la peau. Il est composé de quinze à trente couches de kératinocytes cornifiés, appelés cornéocytes. Les cornéocytes remplis de β kératine sont organisés en une structure de type « briques et mortier » (Elias, Brown et al. 1979; Proksch, Brandner et al. 2008) (figure B.III.1). Les cornéocytes constituent une barrière stable qui résiste à de nombreux agents réducteurs, à des traitements alcalins ainsi qu'à de nombreux détergents. On distingue deux sous-couches:

La couche compacte ou stratum compactum fait suite à la couche granuleuse et assure la fonction de barrière. A ce niveau les desmosomes sont remplacés par des structures moins complexes, les cornéodesmosomes, assurant une certaine cohésion entre les cornéocytes.

La couche desquamante ou stratum disjonctum. La desquamation des cellules cornées se produit à ce niveau.

Les kératinocytes subissent des changements morphologiques observables lors du passage de la couche granuleuse à la couche cornée. Les granules de kératohyalines se dissolvent dans le cytoplasme et les macrofibrilles de kératines s'y accumulent. Les organites intracellulaires disparaissent progressivement. En ce même temps la membrane cytoplasmique s'épaissit, signe de la formation de l'enveloppe cornée : c'est la cornification (Candi, Schmidt et al. 2005).

III. 2. Jonctions épidermiques: les jonctions imperméables

L'imperméabilité de l'épiderme s'établit au cours de sa maturation et se traduit par l'expression de protéines de jonctions.

Les jonctions serrées ou jonctions imperméables ou tight-junction constituent au niveau de l'épithélium, la barrière physique aux mouvements paracellulaires pour l'eau et les solutés. Dans les kératinocytes, les jonctions serrées sont abondantes mais ne parcourent pas toujours le tour des cellules. Au niveau du stratum granulosum, les jonctions serrées assurent

l'étanchéité de l'épiderme et préviennent contre la perte en eau (Furuse, Hata et al. 2002; Brandner 2009). La jonction est due à des interactions homophiles qui concernent plusieurs molécules d'adhérence. La première, l'occludine est une protéine transmembranaire de 64 KDa, constituée d'une chaîne polypeptidique qui traverse quatre fois la membrane. La deuxième, la claudine est également une protéine transmembranaire de 22 KDa, constituée d'une chaîne polypeptidique qui traverse quatre fois la membrane. La dernière, JAM (Junctional Adhesion Molecule) est une protéine de 33 KDa, constituée d'une chaîne polypeptidique qui traverse une seule fois la membrane. La diffusion de molécules marquées, administrées en injection sous cutanée, est stoppée au niveau des jonctions serrées du stratum granulosum. Cet arrêt montre le rôle joué par ces jonctions dans l'imperméabilité de l'épiderme. On retrouve également au niveau de l'épiderme les protéines ZO-1, ZO-2 et ZO-3 (Zonula Occludens proteins) qui assurent une fonction d'échafaudage (Niessen 2007).

III. 3. Fonctions de l'épiderme

Le caractère imperméable de la peau à l'eau a été d'abord attribué aux strates situées juste sous la couche cornée. La première avancée sur la structure de la couche cornée est réalisée dans les années 1960 à l'aide d'un microscope optique (Christophers and Kligman 1964). Le gonflement de la couche cornée au contact d'une solution alcaline a permis aux auteurs de dire que la couche cornée est composée d'une quinzaine de couches de kératinocytes superposées.

Le modèle actuel (figure B. III. 1) comprend une partie protéique (cornéocytes) et une partie lipidique (matrice extracellulaire) (Elias, Brown et al. 1979; Landmann 1986). Par sa richesse lipidique, cette structure particulière constitue une excellente barrière contre les molécules hydrophiles. Elle est cependant moins efficace contre les molécules liposolubles. De nombreux facteurs de stress peuvent perturber la perméabilité hydrique de cette barrière. L'âge, le stress psychologique, les radiations et l'humidité ou au contraire un environnement trop sec sont autant de facteurs qui augmentent les risques de développer une maladie de la peau.

Le pH de la couche cornée est compris entre 4,5 et 5 à la surface et est proche de 7 pour les couches les plus profondes. Néanmoins, il apparaît que le pH de la couche cornée est

hétérogène et que le gradient observé n'est pas linéaire. La fonction de barrière est dépendante de son pH. Ainsi, les nouveaux-nés qui sont d'avantage sujets à des eczémas présentent un pH 7 au niveau de la couche cornée (Vischer, Chatterjee et al. 2000; Giusti, Martella et al. 2001; Fluhr, Behne et al. 2004). Les propriétés antimicrobiennes de la couche cornée sont également liées à son pH. L'acidité de l'épiderme empêche la croissance de bactéries pathogènes (Korting, Hubner et al. 1990). Le pH influe aussi sur la composition lipidique de la couche cornée et son organisation.

III. 4. Aquaporines de la peau

Dans la peau, les AQP1, AQP3, AQP5, AQP9 et AQP10 sont exprimées. Dans cette partie, je m'intéresse aux rôles joués par ces diverses aquaporines dans ce tissu.

L'aquaporine 1

Notre laboratoire a mis en évidence l'expression de l'AQP1 dans les mélanocytes humains normaux (Boury-Jamot, Sougrat et al. 2006). Son rôle au sein de ces cellules n'a pas encore été étudié.

L'aquaporine 3

En 1995, Frigeri et coll ont montré l'existence de l'aquaporine 3 dans l'épiderme de rat. Notre laboratoire fut le premier à montrer la présence de l'aquaporine 3 dans l'épiderme humain (Sougrat, Morand et al. 2002). Ma et al, 2002 ont montré sa présence dans l'épiderme de souris. L'AQP3 joue un rôle important dans la prévention du dessèchement de la peau via son transport d'eau et de glycérol (Ma, Hara et al. 2002; Sougrat, Morand et al. 2002; Hara and Verkman 2003). Des études récentes ont montré que l'aquaporine 3 pourrait être impliquée dans la prolifération cellulaire et favoriser la formation de tumeurs (figure B. III. 1) (Hara-Chikuma and Verkman 2008; Hara-Chikuma and Verkman 2008). La figure B. III. 2 résume les multiples fonctions que joue l'AQP3 dans l'épiderme.

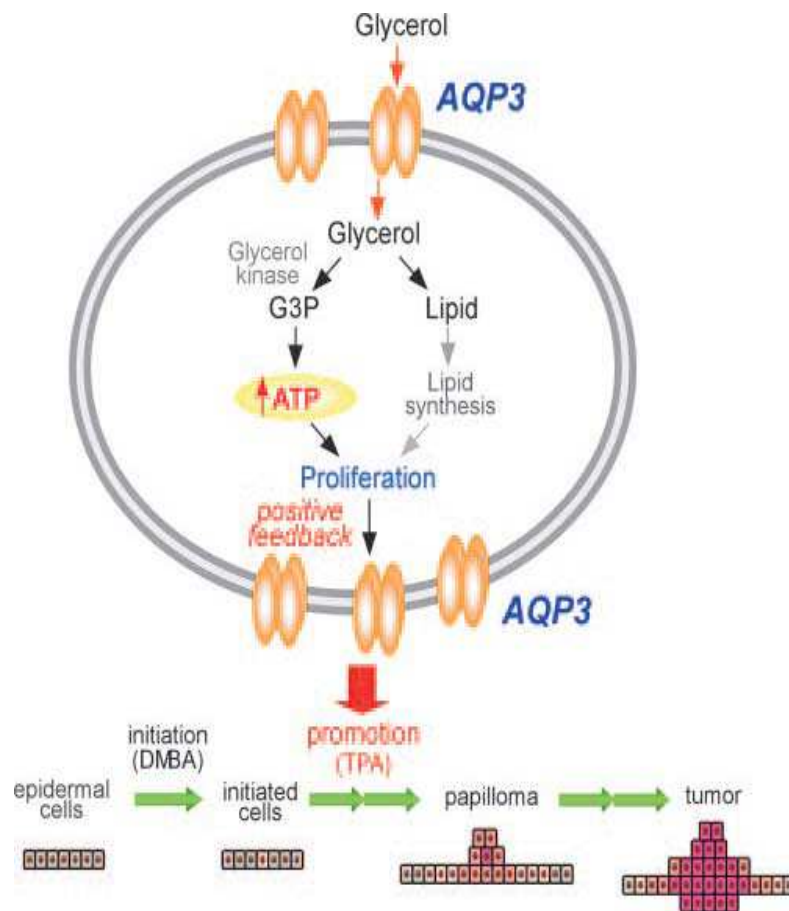


Figure B.III. 1. Mécanisme proposé de promotion tumorale via l'expression de l'AQP3.

Hara-chikuma et al, 2008

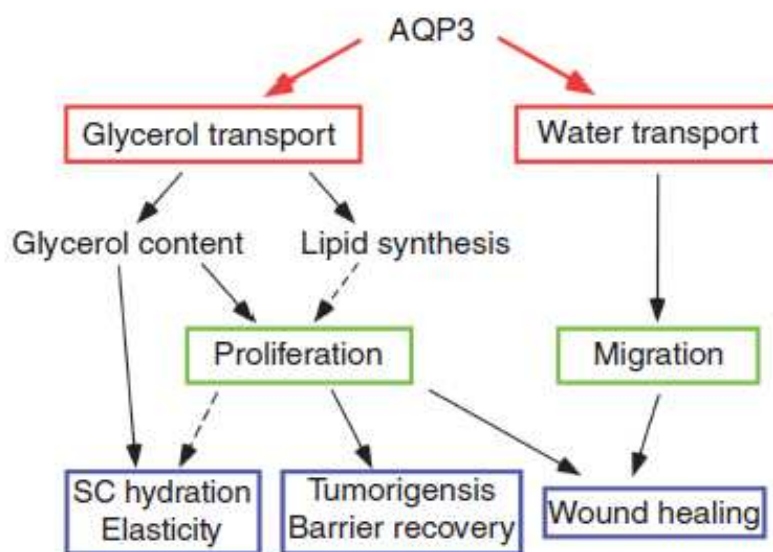


Figure B. III. 2. Mécanisme résumant les fonctions de l'aquaporine 3 dans la biologie de l'épiderme (Hara-chikuma et al, 2008).

L'AQP3 est donc un acteur majeur de la biologie de l'épiderme et une cible potentielle pour le développement des drogues à des fins thérapeutiques.

L'AQP3 intervient également dans la migration cellulaire et dans la cicatrisation des plaies (Hara-Chikuma and Verkman 2008). La restauration de l'épithélium est l'une des étapes cruciales de la cicatrisation des plaies. Cette étape implique la migration et la prolifération des kératinocytes entourant la lésion et l'apparition des follicules pileux et des glandes sudoripares (Martin 1997). Des études ont montré qu'il y a un retard dans la cicatrisation des plaies chez des souris invalidées pour le gène de l'AQP3 (Hara-Chikuma and Verkman 2008). On observe également chez ces souris un retard dans le rétablissement de la barrière cutanée lors d'une altération de la peau (Hara, Ma et al. 2002).

L'aquaporine 5

L'AQP5 est présente dans les glandes sébacées et sudoripares. Elle intervient dans la sécrétion sudorale (Nejsun, Kwon et al. 2002; Ma, Huang et al. 2007).

L'aquaporine 9

L'AQP9 a été détectée dans la couche granulaire des kératinocytes de souris (Rojek, Skowronski et al. 2007). Chez l'humain, l'ARNm de l'AQP9 a été identifiée dans les kératinocytes différenciées en culture (cellules HaCats, (Sugiyama, Ota et al. 2001; Boury-Jamot, Sougrat et al. 2006)). Notre équipe a montré l'expression de l'AQP9 dans les kératinocytes de la couche granuleuse. Cependant, le rôle de l'AQP9 dans la peau n'a pas encore été étudié.

L'aquaporine 10

Découverte récemment, l'AQP10 fait partie aussi des aquaporines les moins étudiées. L'ARN de l'AQP10 est exprimé dans les kératinocytes en culture (Boury-Jamot, Sougrat et al. 2006). Comme l'AQP9, le rôle de l'AQP10 dans la peau n'est pas encore vraiment étudié.

C. LA DIFFERENCIATION EPIDERMIQUE

Dans l'épiderme, les kératinocytes subissent une série de changements morphologiques et biochimiques. Ce processus est connu sous le terme de différenciation.

I. Les étapes de la différenciation épidermique

Le processus de différenciation épidermique se déroule de la manière suivante:

Par l'initiation au niveau de la couche épineuse de protéines structurales de l'enveloppe cornée telles que les kératines-1 (67Kda) et -10 (56,5Kda). Ces kératines se substituent aux kératines 5 (58Kda) et 14 (50Kda) au niveau des desmosomes. Les kératines constituent un grand groupe de 30 polypeptides, regroupant 35 protéines différentes. Leur classification est établie sur la base du poids moléculaire et du point isoélectrique. Les kératines sont divisées en deux familles: les kératines acides de type I (K10- K20) et les kératines neutres ou basiques de type II (K1-K9) (Figure C. I. 1 et tableau) (Eichner, Sun et al. 1986).

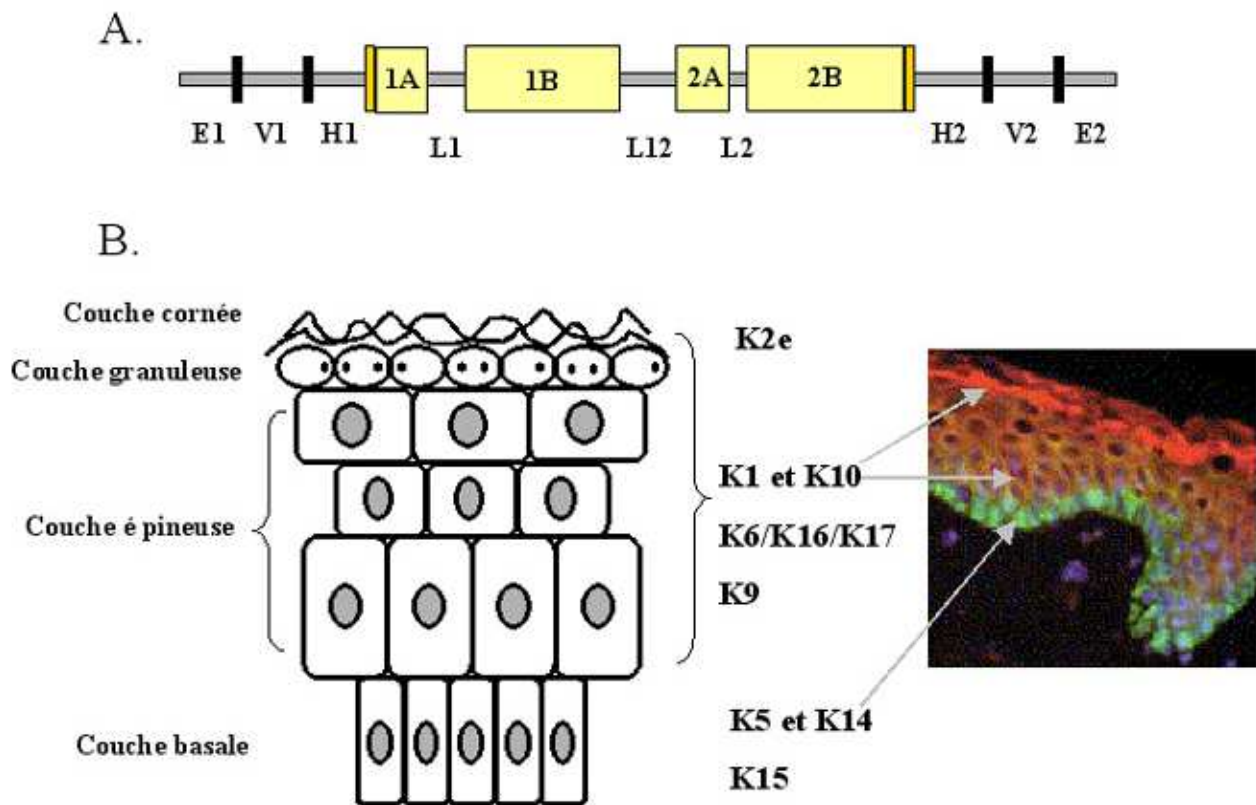


Figure C. I. 1. Structure d'une molécule de kératine et localisation dans l'épiderme.
 Adapté de Porter et Lane, 2003. (A) Les molécules de kératine sont formées d'un domaine α -hélicoïdal central constitué par 4 hélices α très conservées : 1A, 1B, 2A et 2B, séparées par des régions non hélicoïdales L1, L12 et L2. La tête et la queue de la protéine comportent les domaines terminaux E1 et E2, les domaines variables V1 et V2 et les domaines homologues H1 et H2. (B) Les kératinocytes de la couche basale expriment spécifiquement les kératines K5 et K14, tandis que les cellules des couches suprabasales expriment les kératines K1 et K10. La photographie représente un double marquage par immunofluorescence d'épiderme avec un anticorps anti-K5 (vert) et un anticorps anti-K10 (rouge).

Kératine de type I (acides)	Kératine de type II (basiques)	Distribution
K5	K14, K15	Kératinocytes des couches basales des épithéliums stratifiés.
	K19	Sous-populations des kératinocytes des couches basales de l'épiderme, cellules de Merkel.
K1	K10	Kératinocytes des couches différenciées suprabasales de l'épiderme.
K2e		Kératinocytes des couches les plus différenciées de l'épiderme.
	K9	Kératinocytes des couches différenciées suprabasales des épidermes palmoplantaires.
K3	K12	Kératinocytes des couches différenciées suprabasales de la cornée.
K4, K2p	K13	Kératinocytes des couches différenciées suprabasales des muqueuses orales.
K6a-f	K16, K17	Kératinocytes des annexes cutanés et des couches différenciées suprabasales des épithéliums hyperprolifératifs.
K8, K7	K18, K20	Kératinocytes des épithéliums simples.

Tableau: Distribution tissulaire et cellulaire des kératines

On trouve également au niveau de cette couche, d'autres composants tels que l'involucrine, la filaggrine et la loricrine.

L'involucrine est l'un des principaux précurseurs de l'enveloppe cornée. C'est un marqueur très utilisé pour apprécier l'état de différenciation des kératinocytes. C'est une protéine à large hélice α flexible retrouvée en quantité abondante dans les cellules du stratum spinosum. L'involucrine est une protéine « enveloppe », riche en lysine et en glutamine. L'involucrine est déposée sur la surface interne de la membrane plasmique de chaque cellule (Eckert, Yaffe et al. 1993). La filaggrine, riche en histamine, est synthétisée sous forme d'un précurseur, la profilaggrine. C'est une protéine dont le rôle est d'agréger les filaments intermédiaires de kératines au niveau de la formation de l'enveloppe cornée (Asselineau, Dale et al. 1990). La loricrine, représente entre 70 et 85% en masse des protéines totales de la couche cornée. La loricrine est riche en glycine, sérine et cystéine, c'est le composant majeur de l'enveloppe cornée. Insoluble, elle lie les protéines de l'enveloppe cornée entre elles. Elle est en effet, à l'origine des liaisons intra ou inter-chaînes, formant ainsi une structure

fortement insoluble essentielle à la fonction de barrière de l'épiderme (Hohl, Lichti et al. 1991).

Au niveau de la couche granuleuse, se déroule une étape de renforcement. La synthèse des lipides qui seront expulsés pour combler l'espace intercellulaire débute au niveau de l'appareil de Golgi. Les transglutaminases 1 et 5 grâce au calcium vont pouvoir réticuler l'envoplakine et la périplakine sous la membrane plasmique afin d'ancrer les desmosomes (DiColandrea, Karashima et al. 2000; Kalinin, Kajava et al. 2002). Les transglutaminases (TG) sont une famille d'enzymes qui catalysent la réaction de pontage protéique. Cette réaction de pontage a pour conséquence la mise en place de structures supramoléculaires possédant une très bonne stabilité. Elles sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques tels que l'apoptose, la coagulation du sang ou l'assemblage de la matrice cellulaire. Les TG 1, 3 et 5 sont majoritairement exprimées au niveau de l'épiderme. Leur activité enzymatique est indispensable à la mise en place de l'enveloppe cornée et donc, de l'étape terminale de la différenciation kératinocytaire. La TG2 est exprimée de façon ubiquitaire et est localisée dans l'épiderme et le derme. Elle n'est pas impliquée dans la mise en place de l'enveloppe cornée. Par contre, des travaux ont montré que la TG2 est impliquée dans le pontage des protéines de la matrice extracellulaire et contribue donc à la réponse fibroblastique lors du processus de cicatrisation (Lorand and Graham 2003; Stephens, Grenard et al. 2004). Les lipides contenus dans les corps lamellaires sont reliés aux protéines structurales de l'enveloppe cornée. Les TG 1 et 3 permettent de réticuler la loricrine aux SPRs (Small Proline Rich proteins). Ce sont des constituants de l'enveloppe cornée dont l'expression est stimulée lors de la différenciation kératinocytaire (Kartasova, van Muijen et al. 1988).

Les lipides des corps lamellaires (céramides, acides gras et cholestérol) sont reliés par les TG 1 et 5 aux protéines de l'enveloppe à savoir l'envoplakine, la périplakine ou l'involucrine, déjà réticulées entre elles. Les lipides de la couche cornée sont à l'origine de la mise en place d'une barrière perméable (lipides, glycérol) et sont très différents des lipides qui constituent les membranes biologiques. La matrice lipidique intracellulaire se compose des céramides (60%), des acides gras libres (20%) et du cholestérol (20%) (Wertz et al, 2006). Il existe une grande variété de céramides dans la couche cornée. Les acides gras libres sont essentiellement des acides gras à longues chaînes (C22, C24). Au cours du processus de différenciation épidermique, les lipides qui constituent la couche cornée sont stockés sous forme de précurseurs dans les corps lamellaires de la couche granuleuse. Lorsqu'ils sont

sécrétés dans les espaces extracellulaires de la couche cornée, ces lipides sont métabolisés par divers enzymes contenues dans les corps lamellaires (Grayson, Johnson-Winegar et al. 1985). L'exocytose de ces lipides, ainsi que de certaines enzymes des corps lamellaires, est déclenchée par une augmentation du calcium intracellulaire dans les kératinocytes en cours de différenciation. Ces lipides sont ainsi exposés à la surface extérieure des cellules afin de former une enveloppe étanche et hydrophobe.

La réticulation se poursuit au niveau de la couche cornée. Les lipides sont extrudés vers l'extérieur de la cellule. Les cornéodesmosomes remplacent progressivement les desmosomes. Au stade ultime de la différenciation, les cornéocytes sont éliminés par desquamation (Figure C. I. 2) (Candi, Schmidt et al. 2005).

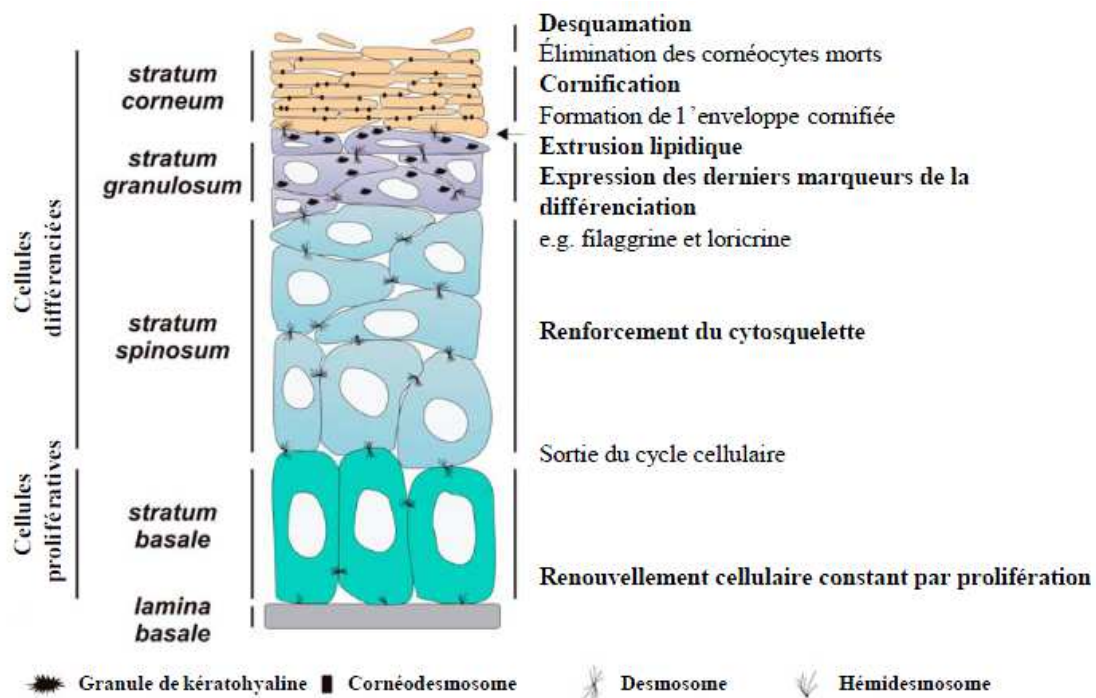


Figure C. I. 2. Représentation schématique des principales étapes de la différenciation épidermique. Denecker et al, 2008

II. Agents inducteurs de la différenciation kératinocytaire

La balance prolifération/différenciation épidermique est sous le contrôle de plusieurs facteurs:

II. 1. Les facteurs de croissance

L'EGF (Epidermal Growth Factor) et le TGF (Transforming Growth Factor) font partie des facteurs de croissance impliqués dans la régulation fonctionnelle des kératinocytes humains. Les kératinocytes humains synthétisent quatre facteurs de croissance de la famille de l'EGF à savoir: $TGF\alpha$, l'amphiréguline, HB-EGF (Heparin Binding-EGF) et l'épiréguline. Ces facteurs de croissance ont pour cible cellulaire le récepteur à activité tyrosine kinase situé au niveau des kératinocytes basaux. Ils régulent le processus de prolifération et de différenciation kératinocytaire de façon autocrine et paracrine.

Les kératinocytes humains synthétisent aussi le $TGF\beta 1$ et le $TGF\beta 2$ qui sont des inhibiteurs efficaces de la prolifération kératinocytaire.

II. 1. 1. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

L'EGFR est impliqué dans la régulation de diverses voies de signalisations telles que la prolifération, la différenciation, la motilité ou la survie cellulaire. Il est également impliqué dans le processus de cicatrisation ainsi que dans la mise en place de la réaction inflammatoire.

L'activation de l'EGFR se fait via plusieurs mécanismes. Il peut être activé directement par des ligands spécifiques ($TGF\alpha$, HB-EGF,...) mais également par des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces récepteurs à sept domaines transmembranaires possèdent un grand nombre de ligands (Calcium, peptides...). La stimulation des RCPGs a pour conséquence l'activation de l'EGFR via l'activité des métalloprotéinases matricielles MMPs (Matrix Metalloproteinases). Par un mécanisme ligand-indépendant, les intégrines peuvent aussi activer l'EGFR (Cabodi, Moro et al. 2004) (figure C. II. 1).

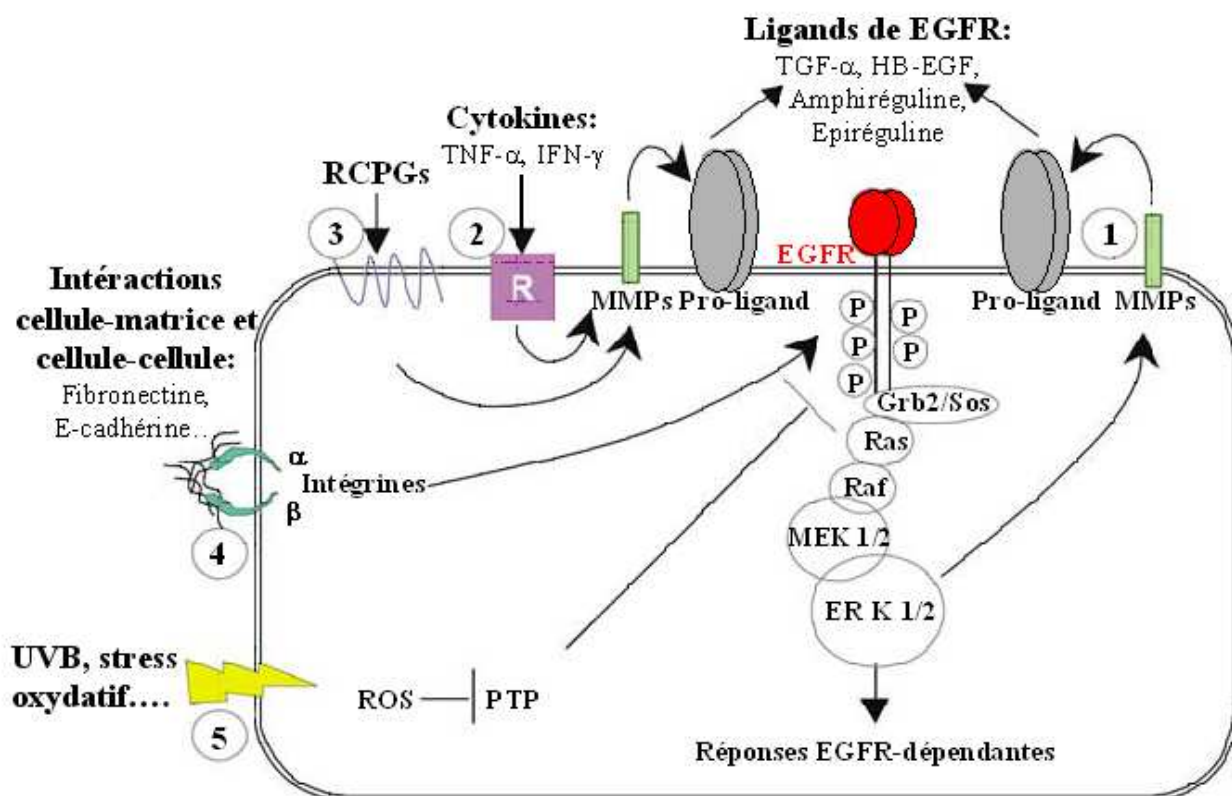


Figure C. II. 1. Mécanisme d'activation de l'EGFR dans les kératinocytes. Adapté de Pastore, al 2008. En absence de stimulation, l'EGFR régule sa propre activation via une boucle auto/paracrine (1). Les ligands des RCPGs tels que les catécholamines ou l'angiotensine (2) mais aussi les cytokines pro-inflammatoires fixées à leur récepteur (3) entraînent la maturation des ligands de l'EGFR via l'activité des MMPs. En outre, les intégrines s'associent à EGFR enfin de déclencher la signalisation EGFR ligand-indépendante (4). Enfin, l'inactivation des protéines tyrosines phosphatases (PTP) suite à la génération intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS) en réponse à des stimuli oxydactifs (5) permet de maintenir l'EGFR sous sa forme active avec éventuellement la stimulation de l'activité ERK

II. 1. 2. Transforming Growth Factor (TGF)

Le TGF α se distingue de l'EGF par le fait qu'il est synthétisé aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Elder, Fisher et al. 1989). Dans la peau psoriasique où les kératinocytes sont en hyperprolifération, on trouve un niveau d'expression de TGF α plus élevé que dans la peau

normale. Par ailleurs des travaux ont montré une augmentation du niveau d'expression de l'EGF-R dans les épidermes tumoraux.

Les facteurs TGF traduisent leurs signaux via leur liaison avec les récepteurs sérine/thréonine kinase (figure C. II. 2).

Le TGF β inhibe la prolifération cellulaire et assure la sortie du cycle cellulaire, première étape indispensable à leur entrée dans le processus de différenciation. Son effet est réversible et s'exerce à de très faibles concentrations, de l'ordre du picomolaire. Le TGF β est exprimé de manière constitutive par les kératinocytes mais nécessite d'être activé pour pouvoir se lier à son récepteur. Il est surexprimé au niveau des couches suprabasales et induit l'expression des marqueurs de différenciation tels que les kératines K1 et K10. A plus forte concentration, il induit l'expression des kératines K6 et K16.

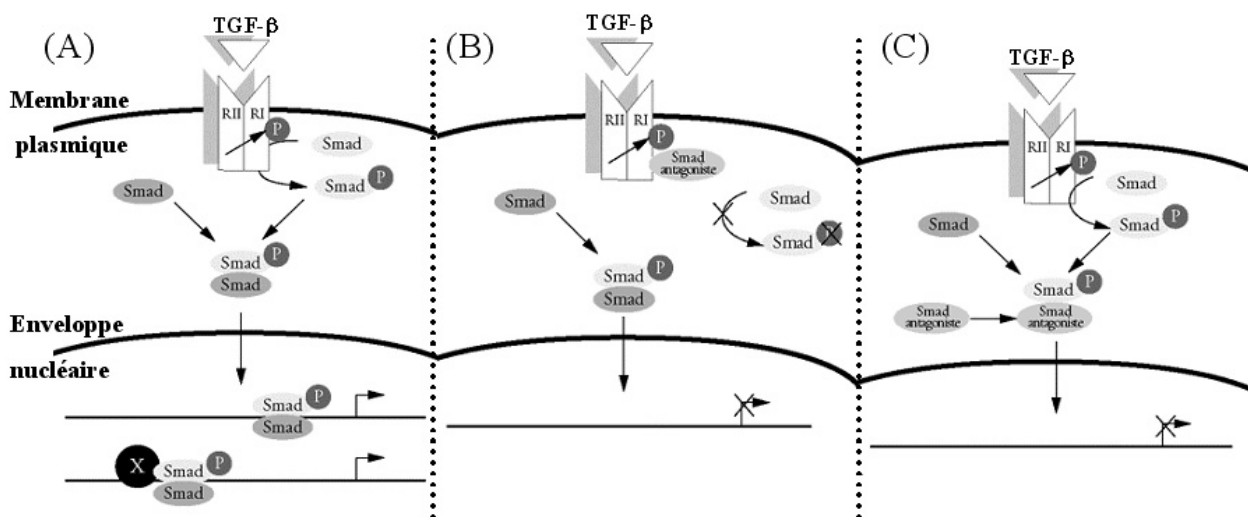


Figure C. II. 2. Représentation schématique de la voie de signalisation induite par le TGF- β . Adapté de (Vignais 1999).

(A) Les SMAD inductibles sont recrutées par le récepteur dont l'activité kinase va permettre leur phosphorylation. A la suite de cette phosphorylation, les protéines SMAD vont s'associer avec les protéines SMAD co-activatrices et ainsi migrer dans le noyau. Ces complexes protéiques ainsi formés se fixent au niveau des séquences promotrices des gènes cibles, soit de façon

directe, soit en associant avec d'autres facteurs de régulation de la transcription.

(B) Les SMAD antagonistes, peuvent entraver la signalisation du

TGF- β de deux façons distinctes. En effet, elles peuvent se fixer au récepteur activé empêchant ainsi le recrutement et l'activation des SMAD inductibles.

(C) Les SMAD antagonistes sont également susceptibles de s'associer de façon compétitrice avec les SMAD co-activatrices ou encore avec les protéines SMAD activées formant ainsi un complexe SMAD inactif.

II. 2. Les rétinoïdes

Les rétinoïdes et en particulier la vitamine A sont connus pour être impliqués dans la régulation du développement et la différenciation de l'épiderme (Fisher, Blumenberg et al. 1995). L'acide rétinoïque, (all- trans - retinoic), diffère de la vitamine A par le remplacement d'un groupement CH_2OH , par celui d'un acide COOH . Parmi tous les rétinoïdes, l'acide rétinoïque est celui qui a le plus d'effet sur la peau. L'acide rétinoïque et son isomère 9-cis-RA se fixent respectivement sur leur récepteur le RAR (Retinoic Acid Receptor) et le RXR (Retinoid X Receptor) (Fisher et al, 1995). Ces récepteurs possèdent plusieurs isoformes. Le contrôle de la différenciation épidermique impliquerait les isoformes $\text{RAR}\delta$ et $\text{RXR}\alpha$. L'acide rétinoïque est un régulateur efficace de plusieurs gènes impliqués dans la différenciation kératinocytaire tels que les kératines, la loricrine, la profilaggrine ou la transglutaminase.

Les effets de la vitamine A sur la peau sont connus et utilisés depuis longtemps (Sullivan et al, 1940). Elle possède un effet inhibiteur sur la différenciation et augmente la prolifération des kératinocytes. La vitamine A se lie à l'intérieur de la cellule à une protéine porteuse (CRBP, Cellular Retinol-Binding Protein) et est stockée soit sous forme d'ester ou utilisée sous forme d'acide rétinoïde. La vitamine A diminue l'expression du facteur de transcription p63 impliqué dans la prolifération de kératinocytes basaux (Bamberger, Pollet et al. 2002) et empêche également la formation de filaggrine et de loricrine qui interviennent dans la formation de l'enveloppe cornée des cornéocytes (Hohl, Mehrel et al. 1991).

II. 3. La vitamine D3

Appelée aussi cholécalciférol, la vitamine D3 est synthétisée à partir d'un dérivé de cholestérol sous l'action des rayonnements UV. Elle n'atteint sa forme active qu'après plusieurs modifications enzymatiques catalysées par les hydroxylases.

II. 3. 1. Production

Elle est produite et métabolisée par les kératinocytes via la vitamine D-25 hydroxylase et la 1α hydroxylase. La vitamine D-25 hydroxylase kératinocytaire et la 1α hydroxylase sont respectivement les enzymes CYP27 retrouvée dans le foie et CYP27B1 retrouvée dans le rein. L'activité enzymatique de ces deux hydroxylases est plus importante dans les cellules non différenciées. En effet, la culture de kératinocyte dans un milieu faiblement calcique $0,1\text{mM Ca}^{2+}$ permet aux cellules de maintenir une activité de la 1α hydroxylase plus importante que lorsque les cellules sont dans un milieu contenant $1,2\text{mM Ca}^{2+}$ (Bikle, Pillai et al. 1989).

Suite à une réaction photochimique due à l'irradiation UVB (solaire), la vitamine D3 est synthétisée dans la peau à partir du 7-déhydrocholestérol (7-DHC). La vitamine D3 ainsi produite est transportée soit vers le foie où elle est convertie en $25(\text{OH})\text{D}_3$, soit métabolisée directement en $25(\text{OH})\text{D}_3$ dans les kératinocytes par l'enzyme : 25-hydroxylase (CYP27). Cette forme intermédiaire est ensuite métabolisée soit en $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, soit en $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ respectivement par les enzymes 24 hydroxylase (CYP24) et 1α hydroxylase (CYP27B1). L'hormone parathyroïdienne (PTH), sécrétée par la glande parathyroïdienne stimule la production de la forme active de la vitamine D3 ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). Il en est de même avec le TNF α (Tumor Necrosis Factor) sécrété par les kératinocytes ou l'interféron γ sécrété par les macrophages (Figure C. II. 3. 1).

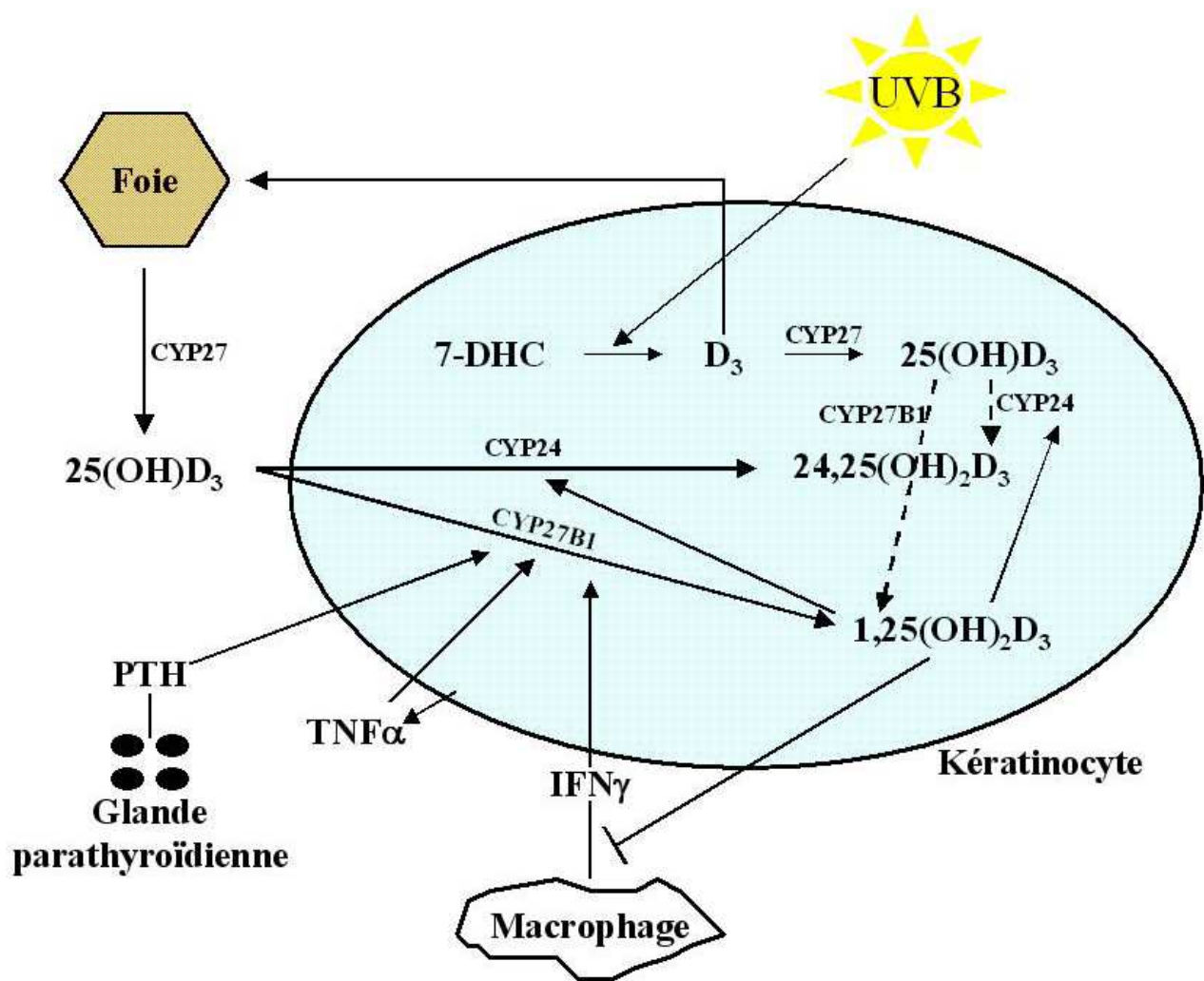


Figure C.II.3. 1. Métabolisme de la vitamine D3. Adapté de Bikle, 2004

II. 3. 2. Calcium et 1,25(OH)₂D₃

Il existe plusieurs mécanismes par lesquels la forme active de la vitamine D3 module la différenciation kératinocytaire. Ces mécanismes chevauchent ceux par lesquels le calcium régule également le processus de différenciation. Le calcium ainsi que la 1,25(OH)₂D₃ ont un effet antiprolifératif mais peuvent stimuler l'expression de l'involucrine ou de la transglutaminase (Su, Bikle et al. 1994). Plus la concentration en Ca²⁺ extracellulaire est importante, plus les kératinocytes sont sensibles à l'effet antiprolifératif de la 1,25(OH)₂D₃. Cette synergie peut s'expliquer par l'induction du récepteur à calcium (CaR) par la 1,25(OH)₂D₃, ce qui rend les kératinocytes plus sensibles au calcium extracellulaire. En outre, le calcium et la 1,25(OH)₂D₃ induisent les enzymes de la famille des PLC (Xie and Bikle

1997). S'en suit une cascade de la voie de signalisation du calcium. Le mécanisme par lequel le Ca^{2+} induit la PLC reste encore flou. La vitamine D3 permet aussi de maintenir *in vivo*, le gradient de calcium, l'élément clé de la différenciation des kératinocytes.

En culture cellulaire, les kératinocytes à confluence continuent de se diviser tout en se resserrant, et expriment des marqueurs de cellules différenciées. Cependant la différenciation n'est complète, que si la concentration en calcium du milieu de culture est augmentée. Les kératinocytes expriment alors des marqueurs de fin de différenciation tels que la filaggrine et la loricrine.

La fixation du calcium sur son récepteur CaR active la PLC ainsi que la liaison du $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sont à l'origine de l'augmentation du Ca_i , d'IP3 et de diacylglycérol (DG). L'augmentation de ces messagers secondaires entraîne l'activation de la PKC. Il s'en suit sa translocation vers son récepteur membranaire spécifique (RACK) et l'ouverture des canaux calciques de la membrane plasmique. La PKC active le facteur de transcription AP-1 qui en combinaison avec le $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ et l'augmentation du Ca_i stimulent la différenciation en induisant les substrats (loricrine, involucrine) et la transglutaminase qui permet de lier ces substrats pour ainsi former l'enveloppe cornée (figure C. II. 3. 2).

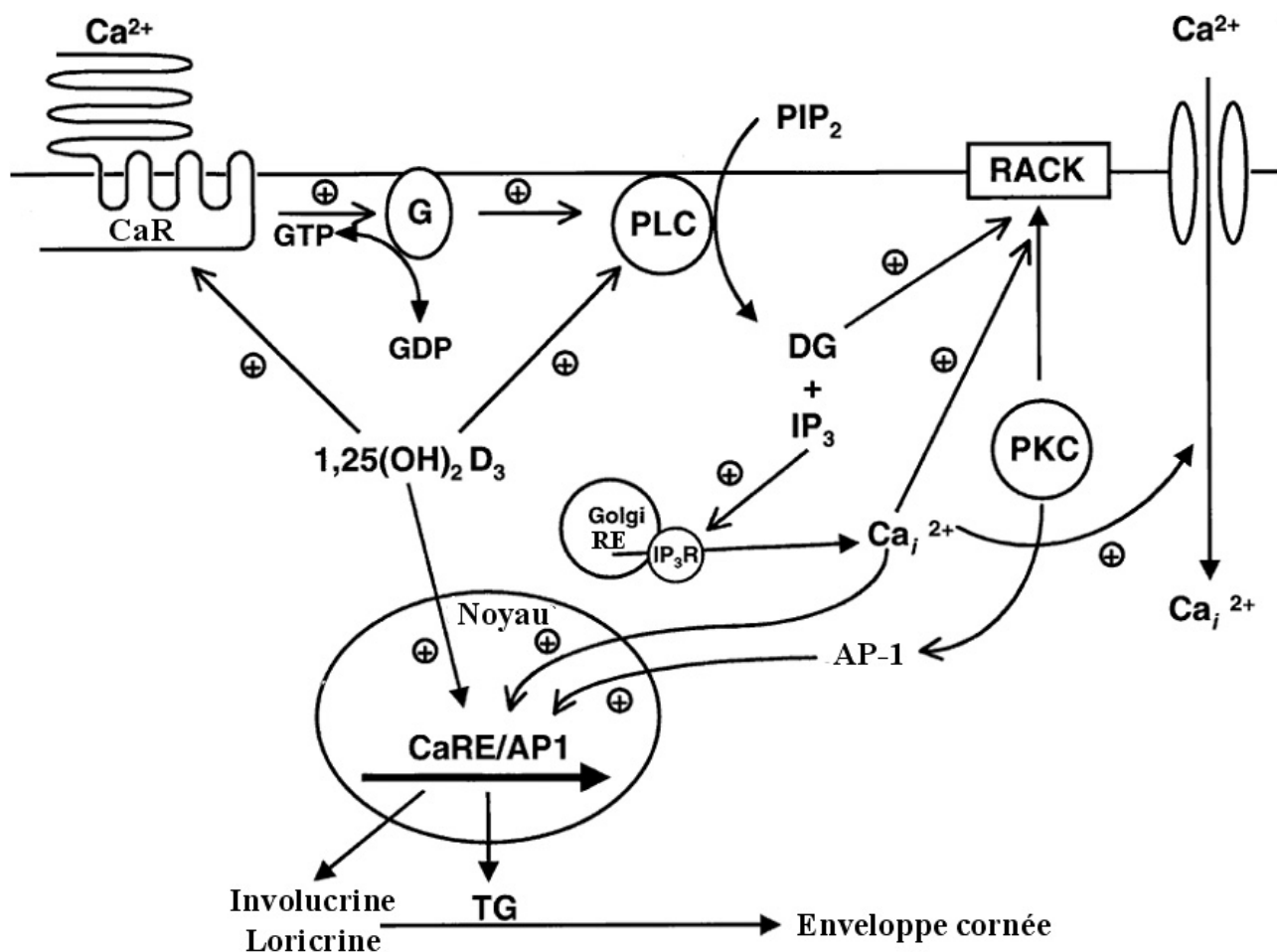


Figure C.II.3. 2. Régulation de la différenciation par la vitamine D3. Adapté de Bikle, 2004

II. 4. Calcium

Le calcium est un second messager universel qui joue un rôle clé dans la régulation des processus cellulaires tels que la sécrétion, la prolifération, la contraction, la mobilité, l'expression de gènes, l'exocytose, la plasticité synaptique et la mort cellulaire. Cette universalité réside dans le fait que les différents signaux calciques peuvent être codés via différentes modes de réponses en faisant varier la fréquence et l'amplitude du signal spatio-temporel dans une cellule unique. (Beliveau and Guillemette 2009). Ringer a montré en 1883 le rôle important joué par le calcium dans la contraction cardiaque chez la grenouille. Le

calcium joue également un rôle dans la signalisation cellulaire. La signalisation cellulaire par le calcium est liée à une augmentation de la concentration interne en calcium. Le signal calcique est caractérisé par son amplitude, sa fréquence, son origine ainsi que sa durée. Il varie de quelques microseconde à plusieurs heures. Pour comprendre l'organisation spatio-temporelle de la signalisation calcique il est nécessaire de décrire les propriétés des canaux calciques qui régulent l'entrée du calcium dans le cytoplasme.

II. 4. 1. Les canaux calciques

D'une manière générale, l'augmentation du calcium est due :

Soit à une entrée (influx) de calcium du milieu extracellulaire via les canaux calciques (Voltage-operated channels « VOCs », Receptor-operated channels « ROCs », Second-messenger-operated channels « SMOCs »). Soit à une libération via les réserves intracellulaires du réticulum endoplasmique (RE). Cette libération se produit suite à l'activation des récepteurs-canaux situés sur le RE. Ces récepteurs peuvent être stimulés soit par l'Inositol tri Phosphate (IP3) lors de l'activation du cycle des phosphoinositides, soit par le calcium lui-même (Berridge 1997).

Une augmentation prolongée du niveau du calcium cytosolique est néfaste pour la cellule car elle provoque le blocage des voies de signalisations. Pour empêcher ce blocage, la cellule doit maintenir un faible niveau de calcium intracellulaire via les « calcium-binding proteins ». C'est l'effet tampon. Il existe alors entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule, un gradient de concentration très élevée des ions Ca^{2+} . La concentration intracellulaire est de l'ordre de 100nM contre 0,1-2mM à l'extérieur. Le maintien de l'homéostasie calcique se fait grâce au fonctionnement des pompes ATPases. La concentration en calcium à l'intérieur du réticulum endoplasmique (RE) est élevée: 100 μM

Dans la plupart des cellules, ce sont les réserves intracellulaires situées au niveau du réticulum endoplasmique qui sont à l'origine de la signalisation calcique. Le réticulum endoplasmique (RE) est constitué de tubules reliés entre eux et formant un réseau dans lequel le Ca^{2+} peut aisément diffuser (Terasaki, Slater et al. 1994; Subramanian and Meyer 1997). Le RE assure de multiples fonctions telles que le stockage et la concentration de molécules, la synthèse de protéines et leurs transports, la détoxification et le métabolisme du calcium. Le

RE est également une structure fortement dynamique qui dépend du cytosquelette. Il existe deux principaux types au niveau du RE: les récepteurs à la Ryanodine (RyR) et ceux à l'Inositol 1,2,3-triphosphate (IP₃) tous composés de quatre sous-unités de masse moléculaires élevées (300-500kD) (Meldolesi and Pozzan 1998).

Récepteur de la ryanodine

Les récepteurs de la ryanodine constituent une classe de canal calcique dans diverses formes de muscles. Ils doivent leur nom à la ryanodine, un alcaloïde végétal pour lequel ils ont une affinité. Leur famille comprend trois membres: RyR1, RyR2 et RyR3. Leur activation, dépendant du potentiel conduit à la libération du Ca²⁺ intracellulaire. Dans les cellules cardiaques et pancréatiques, un autre second messager, l'ADP-ribose cyclique (produit par l'hydrolyse du NAD⁺) intervient également dans l'activation des récepteurs de la ryanodine (Berridge, Lipp et al. 2000).

Récepteur à l'Inositol 1,2,3 triphosphate: IP₃

Le récepteur à l'IP₃ est situé majoritairement au niveau du réticulum endoplasmique, mais une activité IP₃-induced calcium release (IICR) a été mise en évidence au niveau du Golgi et pour certains types cellulaires au niveau de la membrane plasmique (lymphocyte T humain). Il existe trois sous-type de récepteurs à l'inositol 1,2,3 triphosphate, IP₃ R1, IP₃ R2, IP₃ R3. Chez les mammifères, le récepteur à l'IP₃ est présent dans toutes les cellules. Son niveau d'expression peut être modifié pendant le développement, la différenciation ou en réponse aux divers stimuli normaux et pathologiques. Le récepteur de type 1 est celui qui est le mieux caractérisé (Foskett, White et al. 2007).

Le récepteur à l'IP₃ est activé par une cascade de signalisation bien définie qui génère l'inositol triphosphate. La transduction du signal est assurée par l'activation d'une phospholipase C β qui hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate membranaire (PIP₂) en inositol (1,4,5) triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG). L'IP₃ se fixe sur son récepteur présent dans la membrane du RE et provoque une libération massive du calcium réticulaire dans le cytosol (figure C. II. 4). La stimulation du récepteur provoque ainsi une augmentation rapide de Ca²⁺ intracellulaire en utilisant le Ca²⁺ depuis le compartiment intracellulaire (Furuichi, Kohda et al. 1994; Berridge, Bootman et al. 2003).

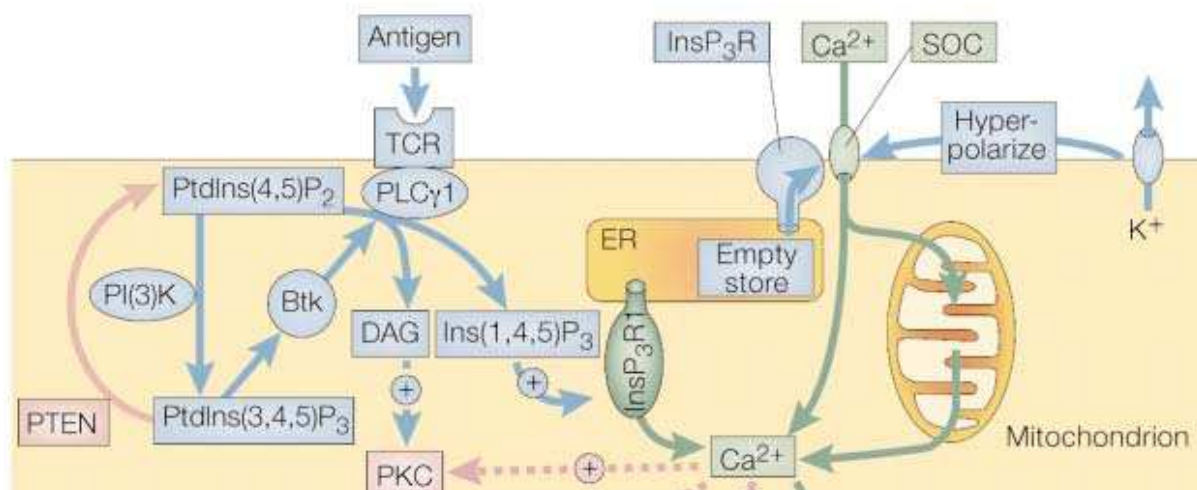


Figure C.II.4 Libération du calcium via l'activation du récepteur à l'IP3.

II. 4. 2. Contrôle de l'homéostasie calcique

Il existe plusieurs systèmes pour contrôler l'homéostasie calcique dont les principaux sont: les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et les calcium-ATPases (Berridge, Bootman et al. 2003).

Les calcium-ATPases sont localisées aussi bien sur la membrane plasmique que sur la membrane du réticulum. Elles appartiennent à la famille des ATPases de type P, assurant le transport actif d'ions, le calcium se déplaçant contre son gradient électrochimique. Ces transports sont beaucoup plus lents que les transports passifs: par exemple, un canal ionique délivre environ 10^7 ions par seconde alors que l'ATPase- Ca^{2+} permet le transport de 10 à 100 ions par seconde.

Calcium-ATPase de la membrane plasmique

Codées par une famille de 4 gènes: PMCA1-4, la distribution des isoformes est ubiquitaire ou localisée selon le type.

La taille de la molécule est de 125-140 kDa. La séquence des calcium-ATPases comporte environ 1200 acides aminés et 10 segments transmembranaires.

La fonction des calcium-ATPases de la membrane plasmique ne se résume pas seulement à maintenir l'homéostasie calcique. Ces protéines ont un rôle plus dynamique dans la signalisation calcique (Garcia and Strehler 1999; Berridge, Bootman et al. 2003).

Calcium-ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA)

Le Calcium est accumulé dans la lumière du RE grâce à des ATPases qui pompent activement le Ca^{2+} depuis le cytosol. Ces pompes, appelées SERCA pour Sarco-Endoplasmique Calcium ATPase, sont produites par 3 gènes différents: SERCA1 à 3. Les gènes SERCA produisent au moins 10 isoformes qui présentent des distributions cellulaires et tissulaires spécifiques.

Les SERCA sont aussi des ATPases de type P, d'environ 110 kda. Ces ATPases sont plus petites que les calcium-ATPases plasmique et comprennent entre 994 et 1043 acides aminés. Les SERCA ont une structure asymétrique, constituée de 3 domaines. L'activité des SERCA est régulée par phosphorylation. Il existe également deux protéines de faible poids moléculaires qui participent à la régulation de l'activité des SERCA. Il s'agit du Phospholamban et de la sarcolipin.

La phospholamban: C'est une protéine de 52 acides aminés qui possède 2 domaines. Elle se présente sous forme de monomère ou de pentamère (la forme active)

La sarcolipin: C'est une protéine de 31 acides aminés qui s'exprime principalement dans les muscles rapides. L'activité de la sarcolipin est contrôlée par le niveau de calcium intracellulaire (Berridge, Lipp et al. 2000; Berridge, Bootman et al. 2003).

Les " Ca^{2+} - binding proteins"

Dans le RE, il y a une concentration élevée de Ca^{2+} , comparable à celle de l'espace extracellulaire, dont la majeure partie est tamponnée en se liant à des " Ca^{2+} -binding proteins". Ces protéines peuvent moduler finement le signal Ca^{2+} en altérant l'amplitude et le temps de retour à la normale du Ca^{2+} transitoire. Les " Ca^{2+} - binding proteins" jouent un rôle important dans le stockage et la libération du Ca^{2+} mais aussi dans les fonctions de base du RE comme le repliement, la maturation et le contrôle des protéines, la modification post-traductionnelle, la synthèse et le métabolisme des lipides ou encore l'adhérence des cellules, le cancer et l'apoptose.

La calréticuline présente dans la lumière du RE est l'une des plus importantes chélateurs de calcium. Elle possède une région C-terminale fortement acide qui lie le calcium avec une forte

affinité. Elle est impliquée dans le stockage du Ca^{2+} dans la lumière du RE mais aussi dans le repliement des protéines nouvellement synthétisées.

La calnexine présente une forte homologie de séquence avec la calréticuline. Les deux protéines sont des chaperons qui partagent plusieurs fonctions, y compris la liaison du Ca^{2+} , et l'identification des protéines synthétisées incorrectement. La différence majeure entre ces deux protéines, est que la calnexine est une protéine intégrale de type I de la membrane du RE tandis que la calréticuline est une protéine de la lumière du RE, qui peut voyager librement dans le RE. Le rôle de la calréticuline dans l'homéostasie calcique et le transport de Ca^{2+} a été bien étudié. On sait que la surexpression de la calréticuline augmente la capacité de stockage du Ca^{2+} dans le RE, tandis que dans les cellules déficientes en calréticuline, cette capacité de stockage est réduite. La calréticuline et la calnexine modulent la fonction de SERCA et/ou du RIP3 (Michalak, Robert Parker et al. 2002; Bedard, Szabo et al. 2005). D'autres protéines sont aussi présentes dans la lumière du RE: le grp94, la famille des protéines PDI (PDI, ERp72) et BiP. Ces protéines fixent le Ca^{2+} et contrôlent ainsi la quantité de Ca^{2+} libre du RE.

II. 4. 3. Calcium et kératinocytes

Le calcium est un régulateur majeur dans la différenciation des kératinocytes. Des études mettant en évidence l'effet du calcium sur la différenciation des kératinocytes en culture, ont été réalisées *in vitro* (Hennings, Michael et al. 1980; Boyce and Ham 1983).

II. 4. 3. 1. Effets du calcium sur la culture des kératinocytes

En 1979, Green et ses collaborateurs ont montré sur les cellules de l'épiderme humain que la présence d'ions calcium était nécessaire à la formation de l'enveloppe cornée par les transglutaminases. Au sein de l'épiderme, il existe une concentration croissante de calcium en remontant vers la surface tissulaire (Menon, Grayson et al. 1985) (figure C. II. 4. 3. 1). D'autres études ont montré qu'en présence d'un milieu faiblement calcique (0,07mM), les cellules kératinocytaires prolifèrent plus rapidement et présentent des propriétés de cellules basales (Boyce and Ham 1983). L'augmentation de la concentration calcique (1 à 2mM), provoque la synthèse de la transglutaminase et d'involucrine permettant ainsi la formation de

l'enveloppe cornée et la stratification (Watt 1984). Elle provoque aussi un arrêt de la croissance cellulaire et l'induction de marqueurs de différenciation. Cette augmentation de la concentration calcique induit également la formation de desmosomes et entraîne la redistribution de plusieurs protéines dont les cadhérines (Hennings, Michael et al. 1980). Au cours de ces processus, on assiste aussi au réarrangement des filaments d'actine dont la perturbation pourrait bloquer la redistribution de certaines protéines et ainsi bloquer la différenciation. La différenciation des kératinocytes après ajout de Ca^{2+} dans le milieu de culture se fait de façon lente. Dans les heures qui suivent cette augmentation de la concentration du Ca^{2+} extracellulaire, les kératinocytes synthétisent les kératines suprabasales K1 et K10 (Yuspa, Kilkenny et al. 1989), suivi par une augmentation du taux de profilaggrine, de loricrine, d'involucrine. Cependant, une diminution de cette concentration au niveau des kératinocytes de la couche granuleuse a pour conséquence l'exocytose des corps lamellaires, alors que son augmentation ralentit ce processus (Elias, Ahn et al. 2002). Des expériences ont mise en évidence la présence d'un élément de réponse au calcium: CaRE (Calcium Responsive Element). Ce CaRE contient un site AP1 indispensable à l'augmentation de l'expression transcriptionnelle de l'involucrine lorsque les kératinocytes sont cultivés en présence de 1,2mM de Ca^{2+} (Ng, Shafae et al. 2000). Les expressions de la filaggrine (Dale, Scofield et al. 1983), de la loricrine (Hohl, Lichti et al. 1991) et de K1 (Huff, Yuspa et al. 1993) sont aussi modulées en fonction de la concentration en Ca^{2+} du milieu de culture.

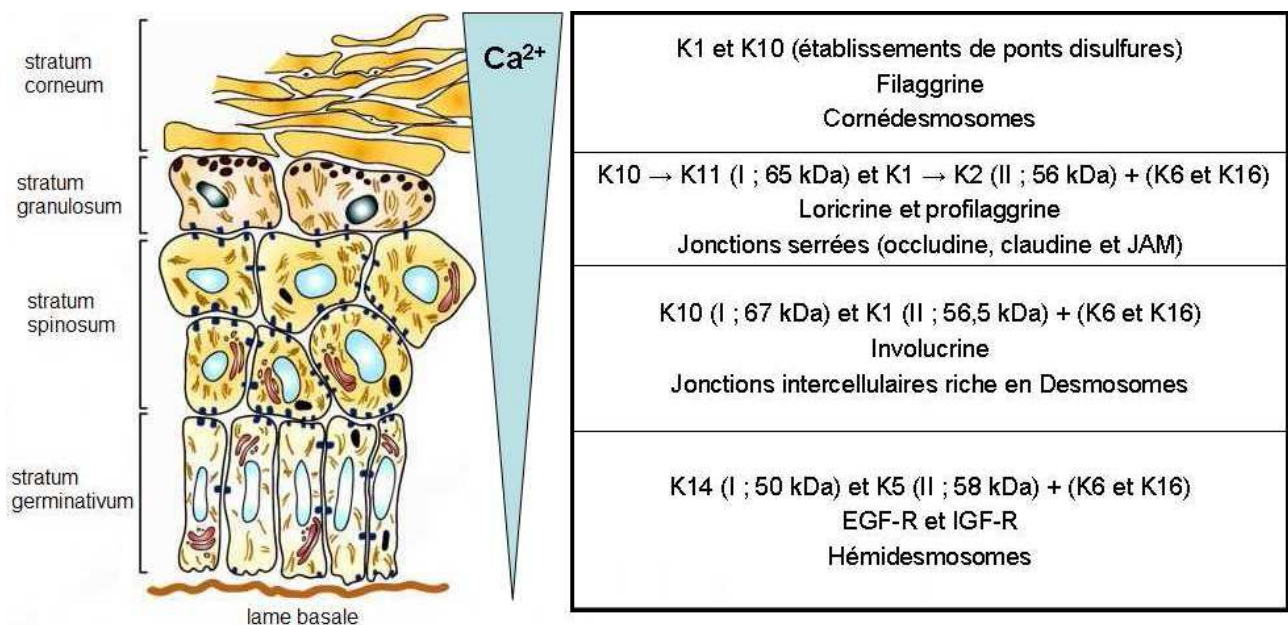


Figure C. II.4.3. 1. Gradient de concentration du calcium et expression des quelques marqueurs de différenciation par les kératinocytes. Adapté de Fuchs, 2008

II. 4. 3. 2. La signalisation calcique dans les kératinocytes

L'augmentation de la concentration extracellulaire en Ca^{2+} de 0,07 à plus de 1 mM entraîne l'élévation de la concentration calcique intracellulaire (Ca_i) qui peut être considérée comme un précurseur de la différenciation kératinocytaire *in vitro*. Cependant, l'ATP ou l'EGF provoquent l'augmentation de la concentration Ca_i sans stimuler la différenciation kératinocytaire. Ceci montre la complexité de la signalisation calcique dans la différenciation kératinocytaire (Pillai and Bikle 1992).

Le calcium extracellulaire se fixe par l'intermédiaire d'une protéine à sept domaines transmembranaire couplée à une protéine G, nommée CaR (Calcium Receptor). Ce récepteur est localisé au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes.

L'induction du CaR par le Ca^{2+} provoque l'activation de la phospholipase C (PLC) qui convertit le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate en diacylglycérol (DG) et en inositol 1,2,3-triphosphate (IP3). Ce dernier se fixe sur son récepteur IP3R localisée à la surface de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi. Ceci entraîne la libération du calcium de ces organites de stockage et une augmentation du Ca_i . Le Ca^{2+} active

aussi la PLC γ via les kinases Src et PI3K (phosphatidyl inositol 3 Kinase) (figure C. II. 4. 3. 2). Cette augmentation du Ca $_i$ active directement les canaux de la membrane plasmique, ce qui amplifie l'influx calcique prolongeant ainsi l'élévation du Ca $_i$. Cette élévation du Ca $_i$ est régulée afin d'empêcher une trop forte stimulation des réponses cellulaires ainsi que la cytotoxicité due à cette élévation prolongée du Ca $^{2+}$ cytosolique. Il existe donc au niveau des kératinocytes une homéostasie du calcium qui implique les protéines cytosoliques qui fixent le Ca $^{2+}$, les pompes à calcium (Ca $^{2+}$ -ATPases) ainsi que les canaux échangeurs Ca $^{2+}$ -Na $^{+}$ de la membrane plasmique, mais également les organites de stockage du calcium que sont le RE ou l'appareil de Golgi (Bikle, Oda et al. 2004).

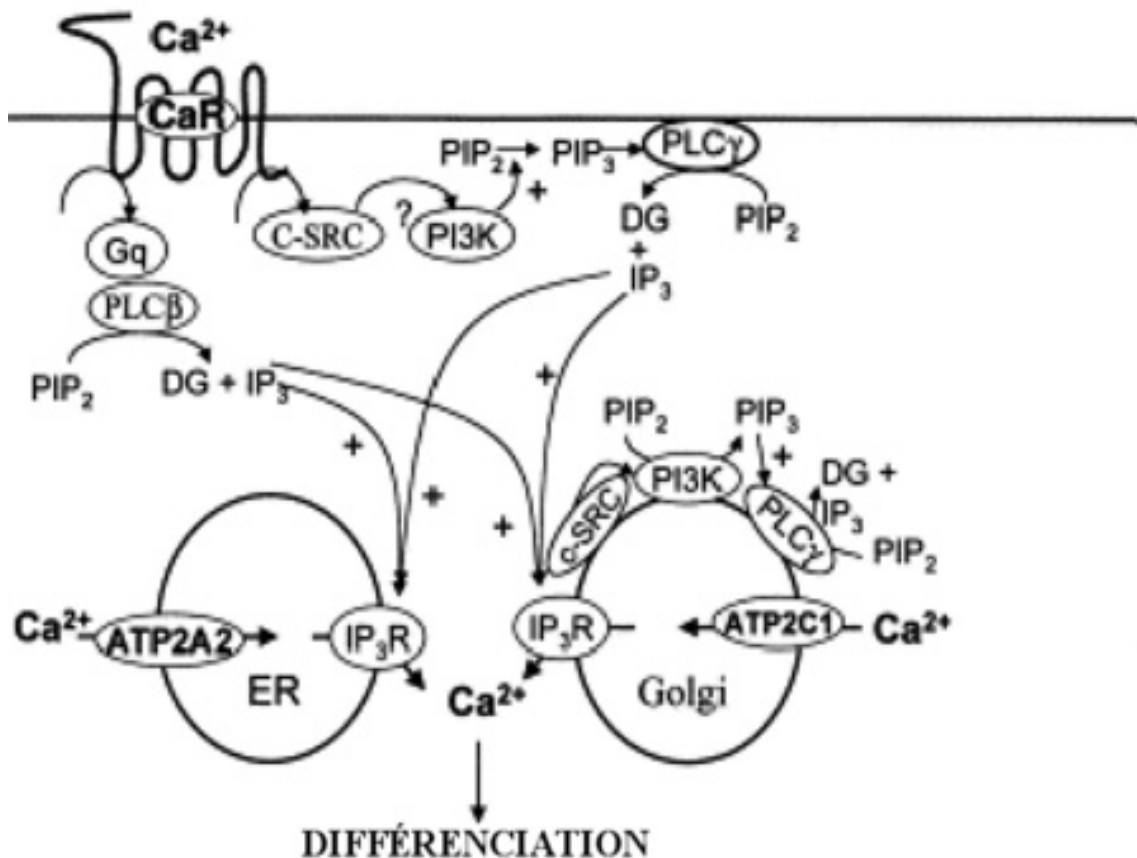


Figure C. II.4.3. 2. Modèle de signalisation calcique kératinocytaire. Adapté de Bikle, 2004

Le calcium intervient également dans la formation de la couche cornée des cornéocytes (Nemes, Marekov et al. 1999) et son ajout en culture augmente la synthèse des céramides (Watanabe, Wu et al. 1998).

Plusieurs maladies sont liées à une répartition anormale du calcium dans l'épiderme, telles que le psoriasis ou la dermatite atopique. La maladie génétique de Darier, est due à la mutation d'une protéine servant de pompe à calcium intracellulaire. Cette maladie induit une hyperprolifération des kératinocytes, une kératinisation anormale, ainsi qu'une perte d'adhésion entre les cellules (Missiaen, Robberecht et al. 2000).

III. La polarité cellulaire

La polarité cellulaire est une caractéristique fondamentale des cellules qui régit de nombreuses fonctions biologiques. Au cours du développement, la polarité des cellules se traduit par une ségrégation asymétrique de facteurs de différenciation à des pôles opposés de la cellule, donnant naissance à deux cellules filles. Dans les cellules différenciées, comme les cellules épithéliales, le pôle apical est très nettement distinct du pôle basolatéral (Etienne-Manneville 2003).

Lorsque les fibroblastes migrent, ils développent une morphologie polarisée. Cette morphologie est caractérisée par la mise en place de renflements membranaires, filopodes et lamellipodes et par le recrutement d'extrémités « + » de microtubules en croissance. Il s'en suit une réorganisation du centre organisateur des microtubules et de l'appareil de Golgi dans le sens de la migration. Pour chaque processus, la dynamique des réseaux actiniques et microtubulaires doit être régulée et coordonnée (Goode, Drubin et al. 2000). Les GTPases de la famille Rho jouent un rôle important dans la polarisation et la migration de nombreux types cellulaires, tels que les fibroblastes (Nobes and Hall 1999) et les cellules nerveuses comme les astrocytes (Etienne-Manneville and Hall 2001; Etienne-Manneville 2003; Etienne-Manneville and Hall 2003). La découverte et la caractérisation d'effecteurs des protéines Rac et Cdc42, notamment IQGAP1 (Kuroda, Fukata et al. 1996) ont permis de connaître plus en détail les mécanismes moléculaires qui contrôlent la dynamique du cytosquelette. L'IQGAP1 est une protéine multi-modulaire appartenant à la famille des « IQ-GAP » (Weissbach, Settleman et al. 1994). Dans les cellules épithéliales, l'IQGAP1 est localisée au niveau des jonctions

adhérentes où elle se lie à la β caténine et à des renflements membranaires (Kuroda, Fukata et al. 1997). Les Rho GTPases agissent également sur l'organisation et la dynamique des microtubules (Fukata, Nakagawa et al. 2003; Gundersen, Gomes et al. 2004). La polarité cellulaire requiert le recrutement des extrémités « + » des microtubules en croissance au niveau des régions membranaires corticales particulières. Des travaux réalisés avec des protéines fusionnées à la GFP (Schuyler and Pellman 2001) révèlent que les protéines se liant aux extrémités « + » des microtubules, incluant les protéines CLIP-170 (Cytoplasmic Linker Protein) (Perez, Diamantopoulos et al. 1999) et EB-1 (famille de protéine + Tips) (Mimori-Kiyosue, Shiina et al. 2000), sont nécessaires pour lier les microtubules à des sites corticaux précis. Il se forme un complexe multi-protéique au niveau du « leading edge » de cellules en migration incluant les protéines Rho GTPases Rac et Cdc42 actives, IQGAP1 et les protéines liées aux microtubules CLIP-170, EB-1 et la protéine APC (Fukata, Watanabe et al. 2002; Watanabe, Wang et al. 2004; Noritake, Watanabe et al. 2005) (figure C. III.). Ces mécanismes se déroulent suivant une certaine chronologie pour promouvoir une polarisation et une migration optimales. L'expression, d'une IQGAP1 privée de son domaine d'interaction avec les protéines Rac1/Cdc42 induit la perte de ce mécanisme de polarisation et conduit à la formation de plusieurs « leading edges » (Fukata, Watanabe et al. 2002). D'autre part, les diminutions de la quantité d'IQGAP1 et d'APC (Adenomatous Polyposis Coli) respectivement par ARN interférence inhibent la formation d'un réseau d'actine et le recrutement de microtubules au « leading edge » de la cellule. Ceci a pour conséquence l'absence de polarisation et de migration cellulaire (Watanabe, Wang et al. 2004).

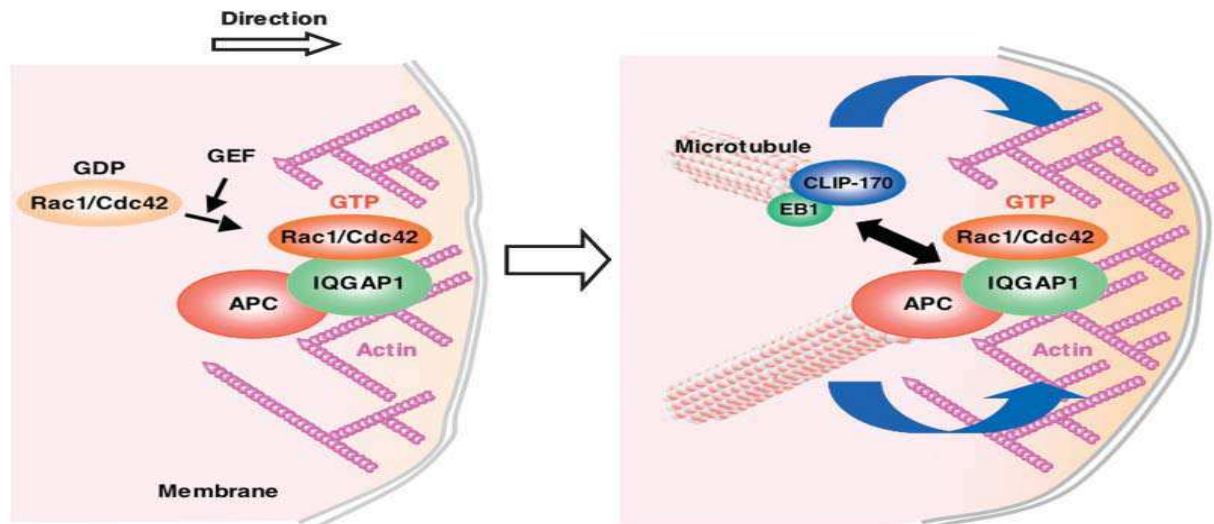


Figure C. III. IQGAP1 dans la polarité cellulaire et la migration directionnelle.
Watanabe et al, 2004.

Les formes actives de protéines Rac et Cdc42 se positionnent au « leading edge » des cellules qui se préparent à migrer, recrutent la protéine IQGAP1 qui sert de plate forme pour l'organisation du réseau d'actine. Ceci permet le recrutement des protéines APC, EB-1 et CLIP-170, chargées d'amener les microtubules au niveau de ces protusions membranaires.

D. TRAFIC DES AQUAPORINES

I. Transport vésiculaire entre les compartiments intracellulaires

Dans les cellules eucaryotes, l'homéostasie des membranes et la sécrétion, impliquent des transports de vésicules membranaires. Ces vésicules se forment par bourgeonnement à partir d'un compartiment pour fusionner avec un autre. Il existe deux principales voies de transport. La voie de l'exocytose, va du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique en passant par l'appareil de Golgi. La voie de l'endocytose, va de la membrane plasmique au lysosome

Lorsque les vésicules doivent se déplacer sur de longues distances, elles sont transportées le long des voies du cytosquelette (figure D. II. 1) (Mostov, Verges et al. 2000).

Principe de la scission et de la fusion

Le bourgeonnement d'une vésicule à partir d'un organite suivi de la fusion avec une deuxième membrane permet le transport des protéines solubles tout autant que des protéines membranaires intégrales vers un autre compartiment. Le processus requiert la polarité de la membrane et du compartiment qu'elle délimite. Le côté d'une protéine membranaire intégrale qui faisait face à la lumière du premier compartiment, fait toujours face à la lumière du deuxième compartiment à la fin du processus.

Les vésicules sont formées par un processus au cours duquel une cargaison est capturée et la membrane lipidique est formée avec l'aide de protéines cytosoliques en un bourgeon. Ce bourgeon est ensuite détaché par scission. Il existe deux types de vésicules : les vésicules recouvertes de coatomère et les vésicules recouvertes de clathrine. Le revêtement (coatomère ou clathrine) doit être éliminé avant que la fusion de la vésicule avec sa membrane cible ne se fasse. Cette fusion est sous le contrôle de deux types de protéines : les protéines SNARE et le GTPases de la famille Rab (Ikonen, Tagaya et al. 1995; Lapierre, Kumar et al. 2001; Roland, Kenworthy et al. 2007).

Le réseau trans-golgien et la sécrétion des protéines

Dans l'appareil de Golgi, les protéines subissent leur maturation finale. La plupart des protéines en arrivant dans l'appareil de Golgi ont déjà reçu toutes les modifications nécessaires, les rendant ainsi fonctionnelles et leur permettant de déterminer leur destination finale (Goud and Gleeson 2010). En outre, le réseau trans-golgien est le lieu de tri des protéines dans les vésicules appropriées. Ces vésicules sont ensuite expédiées dans l'une des trois voies principales : la sécrétion constitutive, la sécrétion régulée ou le transport vers les lysosomes.

Lorsque la membrane des vésicules vient au contact de la membrane plasmique, elle fusionne avec celle-ci. Au point de fusion, la membrane est rompue, le contenu de la vésicule est expulsé vers l'espace extracellulaire et la membrane de la vésicule devient une partie de la membrane plasmique. C'est l'exocytose. Les protéines membranaires de la vésicule sont retirées de la membrane plasmique par endocytose et sont transportées aux endosomes.

Certaines vésicules sont ensuite adressées aux lysosomes pour y être dégradées. D'autres sont recyclées via les endosomes de recyclages, c'est le cas dans le cycle de l'AQP2 (Orzech, Schlessinger et al. 1999).

Protéines d'adressage au lysosome

Les protéines destinées au lysosome sont synthétisées sur le réticulum endoplasmique rugueux et possèdent toutes un oligosaccharide ajouté contenant du mannose. Ne possédant pas de signal de rétention pour le réticulum endoplasmique, les protéines sont transportées vers l'appareil de Golgi. Dans l'appareil de Golgi, les protéines destinées au lysosome sont modifiées par phosphorylation de certains de leurs résidus mannose pour former le mannose-6-phosphate. Dans le réseau trans-golgien, des récepteurs spécifiques du mannose-6-phosphate reconnaissent ce signal de tri. Les protéines sont alors empaquetées dans des vésicules et sont transportées vers le lysosome où elles fusionnent. Les matériaux non désirés sont dégradés au niveau du lysosome (Stephen Bolsover et al, 2006).

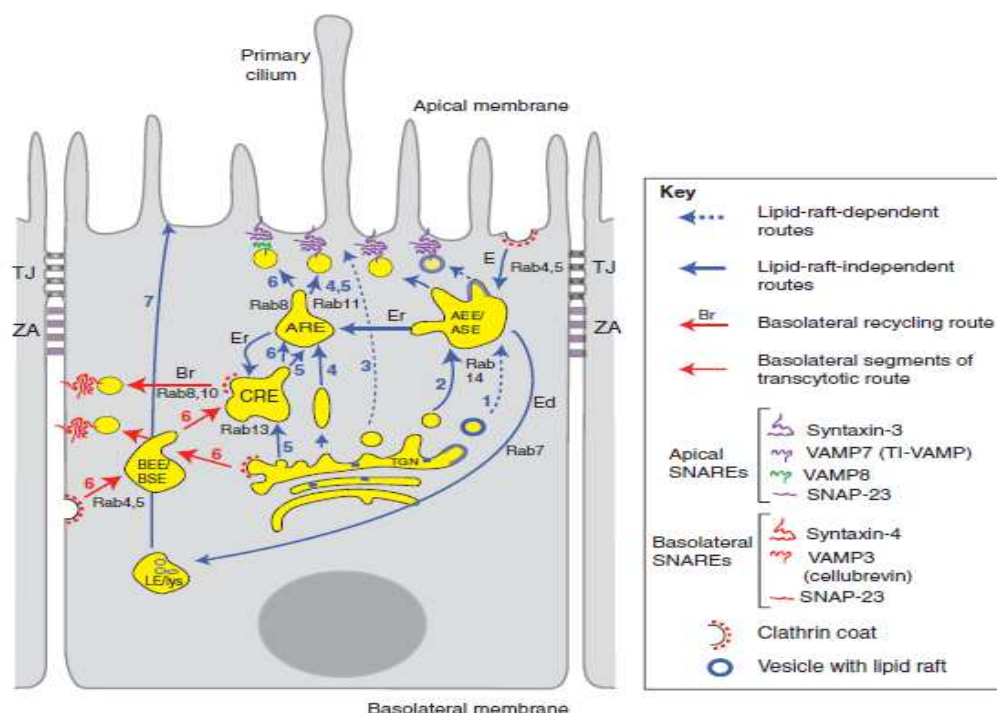


Figure D. II. 1. Exemple de trafic dans les cellules MDCK. (Weisz and Rodriguez-Boulant 2009).

(1) Voie des lipides raft et protéines de cette voie : dipeptidylpeptidase 4, la GPI-APs.

- (2) Voie de la rhodopsine.
- (3) Cette voie pourrait être utilisée par des protéines solubles sécrétoires afin d'éviter la voie de dégradation.
- (4) Voie suivie par les protéines non raft.
- (5) Un variant apical de la protéine VSVG est pensé pour passer à travers la « Common Recycling Endosome (CRE) » suite à son passage par le « Trans Golgi Network (TGN) ». On ignore cependant si le transit par le « Apical Recycling endosome (ARE) » à lieu aussi.
- (6) La pIgR utilise une combinaison des signaux de tri basolatéral et des signaux de transcytoses pour transiter d'abord par la membrane basolatérale et ensuite à la membrane plasmique apicale via « Basal Early Endosome/ Basal sorting Endosome (BEE/BSE) », « Common Recycling Endosome (CRE) » et « Apical Recycling Endosome (ARE) »
- (7) Voie typique d'exocytose des exosomes, suggérant l'existence de mécanismes de tri à des endosomes tardifs.

(Er) : endosomes de recyclage, (d): endosomes de dégradation, (Br) : voie de recyclage basolatérale, (E) : endosomes, (LE) : endosomes tardifs, (Lys) : lysosome, (TJ) : jonctions serrées, (ZA) : zonula adherens

II. Trafic de l'AQP2

Dans les cellules rénales de rat, l'AQP2 est principalement localisée dans les régions nucléaires supérieures. Des expériences de double marquages avec divers marqueurs de compartiments cellulaires ont permis de dire d'une part que le système endosomal joue un rôle primordial dans le stockage et le trafic de l'AQP2 et d'autre part que l'AQP2 n'est ni localisée au niveau du réticulum endoplasmique, ni de l'appareil de Golgi, ni dans le réseau trans-Golgien et non plus au niveau des lysosomes. (Tajika, Matsuzaki et al. 2002).

Compartimentation et trafic intracellulaire de l'AQP2

Des approches protéomiques ont été réalisées en analysant des vésicules provenant du canal collecteur médullaire de rat (Barile, Pisitkun et al. 2005). Parmi les protéines identifiées, nous avons la famille des protéines Rab, en l'occurrence Rab4, Rab5, Rab18, Rab21 des endosomes précoces, Rab7 des endosomes tardifs enfin Rab11 et Rab25 des endosomes de recyclage. Ce qui suggère une relation étroite entre l'AQP2 et le système endosomal. Les protéines SNARE et les « protéines moteurs » telles que les myosines ont été identifiées.

Dans le but d'étudier de manière plus détaillée la compartimentation et le trafic intracellulaire de l'AQP2, des cellules MDCK exprimant une AQP2 humaine ont été utilisées (Tajika, Matsuzaki et al. 2004; Tajika, Matsuzaki et al. 2005; Nedvetsky, Stefan et al. 2007; Vossenkamper, Nedvetsky et al. 2007). Les résultats de ces expériences sont conformes à ceux obtenus avec les cellules rénales de rat à savoir que l'AQP2 est principalement stockée dans des vésicules de la région supérieure du noyau. L'AQP2 colocalise avec Rab11, un marqueur apical des endosomes de recyclage. Outre Rab11, l'AQP2 colocalise également avec EEA1, un marqueur des endosomes précoces. Ceci montre que l'AQP2 est stockée dans un compartiment Rab11-positif au niveau du cytoplasme apical et que les endosomes précoces jouent un rôle important dans son trafic. L'élévation du niveau de l'AMPc par la forskolin conduit à la translocation de l'AQP2 au niveau de la membrane plasmique, comme ce qui a été observé dans les reins suite à une stimulation par l'ADH. A la fin de la stimulation par la forskolin, l'AQP2 est immédiatement internalisée par endocytose (voir figure A. V. 4). Son transfert des endosomes précoces vers le compartiment de stockage rab11, sensible à la wortmannin et au LY294002 suggère que ce processus est dépendant de la phosphatidylinositol 3-kinase. Les filaments d'actine interviennent également dans ce processus puisqu'une accumulation de l'AQP2 dans les endosomes précoces résulte de la désorganisation des filaments d'actine par la cytochalasine D ou latréculine B. Des études ont également montré que la myosine pourrait être impliquée dans le trafic des vésicules AQP2 via Rab11 et Rab11-FIF2 (Noda, Horikawa et al. 2004; Barile, Pisitkun et al. 2005; Noda and Sasaki 2006; Nedvetsky, Stefan et al. 2007).

Endocytose de l'AQP2

Au niveau de la surface cellulaire, l'AQP2 est internalisée dans les vésicules intracellulaires par endocytose. Ceci a été montré par des expériences réalisées en microscopie électronique où, on observe une concentration élevée d'AQP2 dans les puits de clathrine au niveau de la membrane plasmique (Sun, Van Hoek et al. 2002). L'utilisation de dominant négatif de la dynamine 1 ou 2 empêche le détachement des puits de clathrine et induit une accumulation de clathrine et d'AQP2 à la surface cellulaire (Sun, Van Hoek et al. 2002). Ces résultats montrent que l'internalisation de l'AQP2 se fait via les puits de clathrine et est dépendante de la dynamine. L'ubiquitination de l'AQP2 régule son endocytose et par conséquent sa sortie de corps multivésiculaires et des lysosomes (Kamsteeg, Hendriks et al. 2006).

Régulation du trafic de l'AQP2 par sa phosphorylation

L'ADH contrôle la translocation de l'AQP2 à partir des compartiments intracellulaires à la membrane plasmique par sa phosphorylation. L'ADH se fixe sur le récepteur V2 de la vasopressine du côté de la membrane basolatérale et active la PKA via une élévation du niveau de l'AMPc. La PKA phosphoryle la sérine 256 de l'AQP2. Le remplacement de cette sérine par une alanine (S256A) empêche la translocation à la membrane plasmique de l'AQP2. Ce qui montre que la sérine en position 256 est nécessaire pour la localisation de l'AQP2 à la membrane plasmique apicale (Katsura, Gustafson et al. 1997; van Balkom, Savelkoul et al. 2002). L'activation de la PKC par le PMA s'oppose à l'expression de l'AQP2 à la surface cellulaire en induisant son endocytose indépendamment de l'état de phosphorylation de l'AQP2 (van Balkom, Savelkoul et al. 2002).

L'internalisation de l'AQP2 par la prostaglandine E2 et la dopamine sont aussi indépendant de la déphosphorylation de l'AQP2 (Nejsum 2005). Ainsi donc la phosphorylation de la sérine 256 est nécessaire à la translocation de l'AQP2 mais d'autres mécanismes indépendants de la phosphorylation régulent aussi la localisation de l'AQP2.

Régulation du trafic de l'AQP2 par l'actine

Le cytosquelette joue d'importants rôles dans le trafic vésiculaire. En effet, au niveau de la vessie chez les amphibiens et au niveau du canal collecteur rénal chez les mammifères, l'ADH induit la dépolymérisation des filaments d'actine et la fusion des vésicules portant les canaux hydriques à la membrane plasmique apicale (Hays, Condeelis et al. 1993). La phosphorylation de RhoA et son association avec Rho-GDI contrôlent la polymérisation des filaments d'actine, lesquels régulent l'exocytose des vésicules portant l'AQP2 (Tamma, Klusmann et al. 2003). Les résultats des expériences réalisées avec la cytochalasine D et latrunculine B montrent que les filaments d'actine jouent un rôle clé dans le transfert de l'AQP2 à partir des endosomes précoces au compartiment Rab11-positif (Tajika, Matsuzaki et al. 2005). La fixation de l'actine aux vésicules de stockage de l'AQP2 peut constituer un « force generator complex » qui fournit la force nécessaire dans le processus de translocation des vésicules de l'AQP2.

Excrétion de l'AQP2

Dès l'arrêt de la stimulation par la vasopressine, l'AQP2 est internalisée de manière clathrine-dépendante. Elle est alors recyclée ou dégradée au niveau des lysosomes ou éliminée via l'exosome par excrétion dans les urines (figure D. II. 2) (Kamsteeg, Hendriks et al. 2006). De fait, le trafic de l'AQP2 constitue un bon marqueur de l'activité antidiurétique de la vasopressine au niveau rénal.

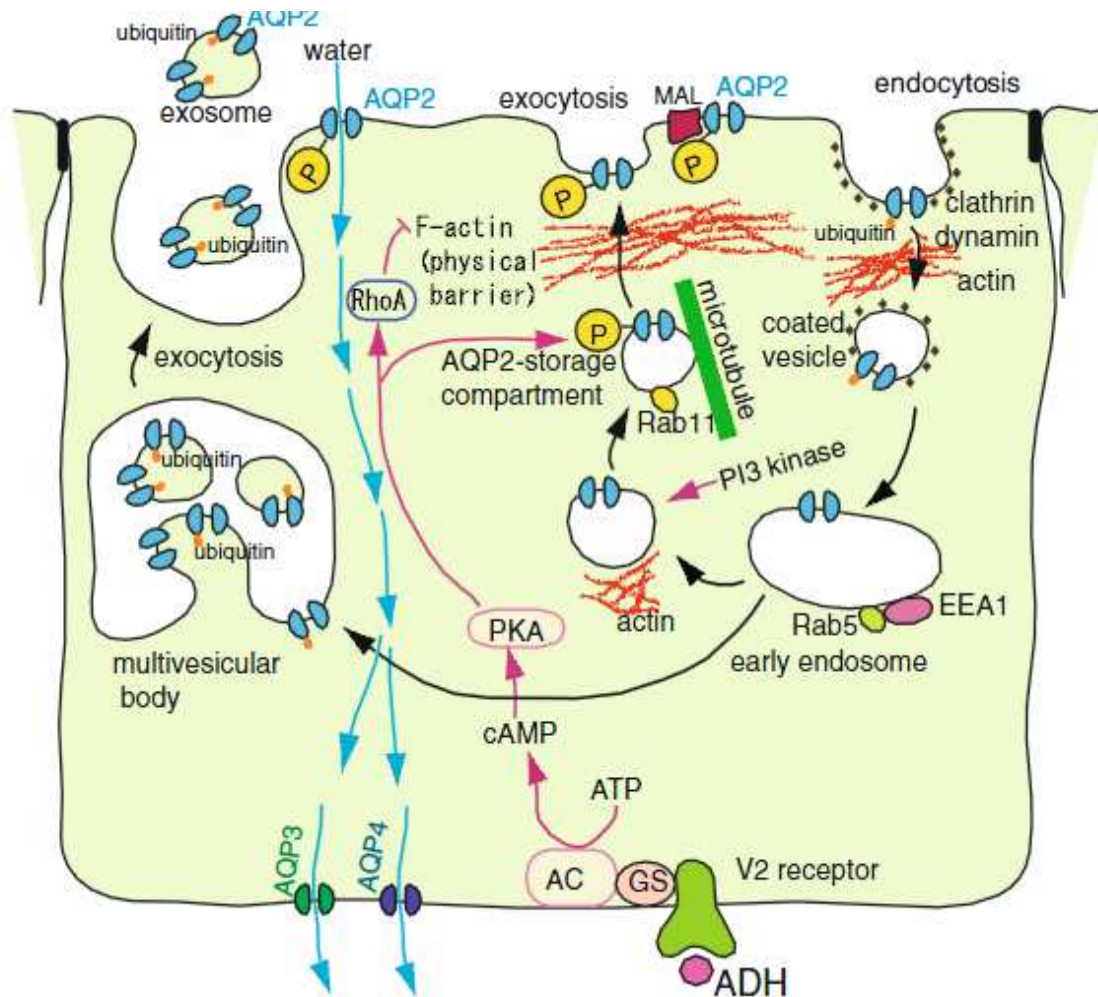


Figure D. II. 2. Schéma montrant la transduction du signal de l'ADH, le trafic de l'AQP2 et le transport transcellulaire de l'eau. Takata et al, 2008

AQP2 est stockée dans des vésicules Rab-11. La fixation de l'ADH au récepteur V2 active l'AC, l'augmentation du niveau de l'AMPc active la PKA. La phosphorylation de l'AQP2 par la PKA entraîne sa translocation à la membrane plasmique apicale.

ADH: Anti-Diuretic Hormone; AC: Adenylate Cyclase; AMPc: adenosine Mono-Phosphate cyclique; ATP: Adenosine Tri-Phosphate; PKA: Proteine Kinase A; V2 receptor: Récepteur à la vasopressine; MAL: protéine associée au lymphocyte et myéline

Objectifs du travail

E. ADRESSAGE DE L'AQP3 DANS L'EPIDERME

La découverte des aquaporines a permis de comprendre au niveau moléculaire la physiologie de l'équilibre hydrique de l'organisme et a apporté des explications physiopathologiques aux désordres du métabolisme de l'eau.

Notre laboratoire s'intéresse depuis longtemps aux aquaporines de la peau. Les travaux réalisés ont permis de montrer la présence de l'aquaporine 3 à la membrane plasmique des kératinocytes du stratum basal et du stratum spinosum. L'aquaporine 3 sert au transport de l'eau et joue un rôle dans l'hydratation des couches vivantes de l'épiderme (Ma, Hara et al. 2002). L'épiderme s'organise en plusieurs couches cellulaires ayant des caractéristiques différentes en fonction de l'état d'avancement de la différenciation cellulaire.

Rachid Sougrat, un étudiant de notre laboratoire a montré lors de ces travaux en 2002, que dans certaines cellules du stratum basal d'épiderme, l'AQP3 a une localisation intracellulaire et que dans certaines cellules des couches supérieures (stratum granulosum), l'AQP3 est localisée à la membrane plasmique.

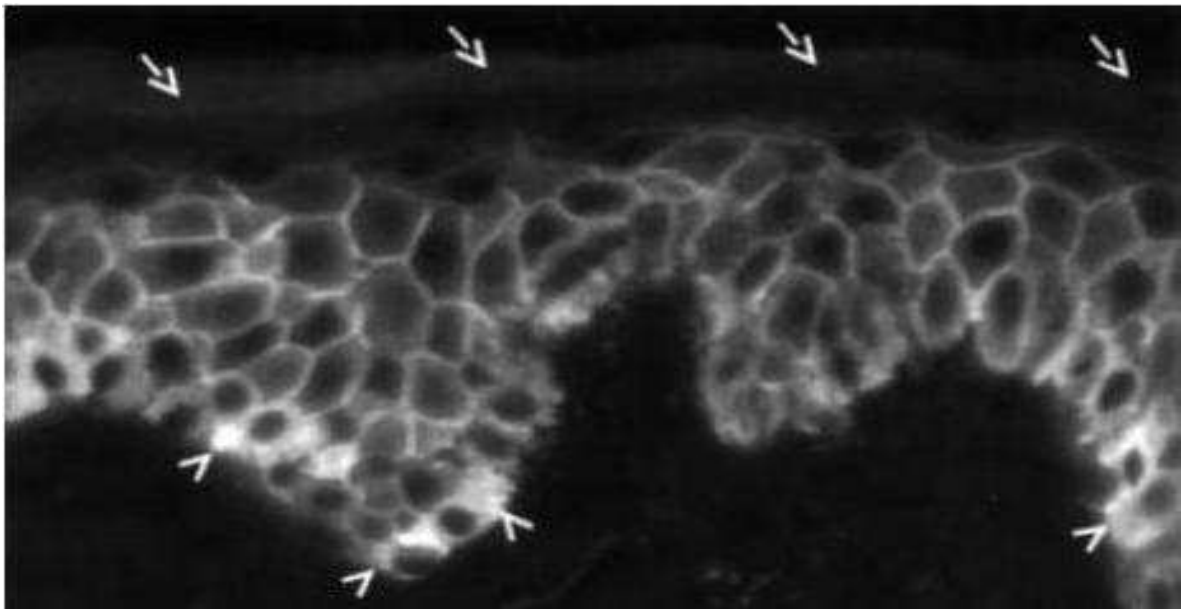


Figure E. Immunomarquage de l'AQP3 montrant deux localisations subcellulaires dans l'épiderme humain. (Sougrat et al, 2002)

Or nous savons que certaines cellules de cette monocouche (stratum basal) sont en prolifération et ne sont pas encore engagées dans un processus de différenciation. A l'inverse, les cellules de la couche supérieure sont dans un état différencié. Nous avons donc émis l'hypothèse, que la localisation intracellulaire de l'AQP3 des cellules de cette monocouche est modifiée par la différenciation cellulaire. En outre, nous savons que le calcium est un facteur de différenciation et qu'il existe un gradient de sa concentration dans l'épiderme qui est faible au niveau des couches basales et élevée au niveau des couches supérieures.

La première partie de mon projet a été de tester cette hypothèse en étudiant l'effet de la différenciation induite par le calcium sur l'adressage de l'AQP3 dans les kératinocytes en culture.

Vu que les aquaporines sont des protéines membranaires, elles sont toutes censées être localisées aux membranes (intracellulaire et plasmique). Tel est le cas pour la majeure partie d'entre elles, exception faite pour l'AQP2. En effet, l'AQP2 est à ce jour la seule aquaporine à avoir une localisation subcellulaire particulière. Intracellulaire, elle est transloquée à la membrane plasmique suite à une stimulation à la vasopressine ou à la forskoline. Nous venons de voir sur la figure E (Sougrat et al, 2002), que l'AQP3 a également une localisation subcellulaire particulière (intracellulaire dans les couches basales et membrane plasmique dans les couches suprabasales) dans les cellules de l'épiderme humain. Jusqu'à ce jour aucune étude ne s'est intéressée à la régulation de l'adressage de l'AQP3 au cours de la différenciation. Notre laboratoire est donc le premier à étudier la régulation de l'adressage de l'AQP3 au cours de la différenciation dans les kératinocytes en utilisant des cellules qui expriment des protéines fluorescentes.

Dans la deuxième partie de mon projet, je vais comparer la régulation de l'adressage de l'AQP3 dans les kératinocytes à celle de l'AQP2 dont on connaît mieux les bases moléculaires du trafic.

Face à la difficulté d'obtention des clones stables avec les kératinocytes, j'ai décidé donc de changer de modèle cellulaire et de prendre les cellules MDCK qui sont également des épithéliales qui proviennent de reins de chien dans lesquelles, les aquaporines ont été largement étudiées. Avec ce nouveau modèle cellulaire, je dois obtenir des clones stables d'AQP3 et d'AQP2 et ensuite je vais:

Etudier l'effet du calcium sur l'adressage de l'AQP3 et de l'AQP2

Etudier les voies de signalisations impliquées dans l'adressage de l'AQP3

Etudier le rôle du cytosquelette

Matériels et Méthodes

I. Culture cellulaire

Au cours de ce travail, nous avons utilisé, des cultures primaires de kératinocytes humain et deux lignées cellulaires; HaCat (Human keratinocyte cell line) et MDCK (Madin-Darby canine Kidney).

I. 1. Culture primaire de kératinocytes

Les cultures primaires de kératinocytes proviennent de Millipore et Promocell. Les cellules sont cultivées à 37°C sous atmosphère contrôlée à 5% de CO₂. Les milieux de culture utilisés sont recommandés par le fournisseur (Promocell) et sont: KBM (Keratinocyte Basal Medium), PCT (Progenitor Cell targeted) Epidermal Keratinocyte Medium et du KSFM (Keratinocyte Serum-Free Medium).

I. 2. HaCat

C'est une lignée immortelle de kératinocytes issue d'une transformation spontanée de kératinocytes humains normaux cultivée à une température élevée de 38,5°C avec une faible concentration calcique (0,2mM) (Boukamp, Petrussevska et al. 1988). Ces kératinocytes présentent l'avantage de garder leur pouvoir de différenciation et de pouvoir reconstituer un tissu épidermique. Etant, une lignée cellulaire, elle devrait être plus simple d'utilisation pour réaliser des transfections stables. Les cellules sont cultivées dans du KSFM (Keratinocyte Serum Free Medium) ou du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) de chez Invitrogen supplémenté par 10% de SVF (Sérum de veau fœtal) de chez Invitrogen aussi à 37°C sous atmosphère contrôlée à 5% de CO₂.

I. 3. MDCK

C'est une population de cellules stables après des mitoses successives. Ce sont des cellules cancéreuses provenant du rein de chien. L'utilisation des MDCK, plus aisée que celle

des cultures primaires en fait un outil de choix pour certaines applications. Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) de chez Invitrogen supplémenté par 10% de SVF (Sérum de veau fœtal) de chez Invitrogen aussi à 37°C sous atmosphère contrôlée à 5% de CO₂. Dans certaines conditions expérimentales, elles sont cultivées avec du milieu EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium).

Il existe deux types de cellules MDCK qui possèdent un profil glycolipidique différent. Des travaux ont montré que seules les cellules MDCK de type II possédaient l'antigène glycolipidique de Forssman, un niveau plus élevé en glycolipides sulfatés ainsi qu'un cil porté par la membrane apicale (Nichols, Lovejoy et al. 1986). Les cellules de type I sont quant à elles enrichies en fucolipides. De plus, ces deux types cellulaires possèdent des caractéristiques fonctionnelles et morphologiques différentes ; les cellules MDCK de type I sont capables de développer une résistance transépithéliale très élevée, pouvant atteindre 4000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, et présentent toutes les caractéristiques morphologiques de l'épithélium du tube collecteur rénal (Richardson, Scalera et al. 1981). Les cellules de type II développent une résistance plus faible de 100 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ et présentent des caractéristiques morphologiques des cellules de l'épithélium du tube distal rénal. Ces dernières sont les plus fréquemment utilisées. Au cours de ce travail, nous avons utilisé les cellules MDCK de type II.

I. 4. Repiquage

Les cellules sont repiquées en moyenne tous les deux jours lorsqu'elles arrivent à confluence. Pour ce faire, les cellules en culture sont rincées deux fois avec du PBS (Phosphate Buffed Saline) sans calcium, ni magnésium (GIBCO) qui a été préalablement chauffé. Puis, les cellules sont décollées par ajout de 1mL trypsine/EDTA (GIBCO) et placées dans l'incubateur pendant un temps variable de 2 à 5mn. Ce temps est dépendant du type cellulaire et de l'état de confluence des cellules. La réaction de trypsinisation est arrêtée par l'addition de milieu de culture contenant du sérum et du calcium. Les cellules sont alors resuspendues puis partagées dans des boîtes de pétri 10cm de diamètre.

I. 5. Congélation

A la suite du décrochage des cellules par la trypsine, la suspension cellulaire est mise dans un falcon de 10ml et centrifugée à 1000 rpm pendant 5mn. Le culot cellulaire obtenu est repris dans un milieu de congélation, « Recovery-cell culture, freezing medium » (GIBCO) ou transféré dans un cryotube de 2ml. Le cryotube est alors stocké à -80°C soit pendant quelques temps (environ 3 mois) soit indéfiniment dans l'azote liquide (-180°C).

I. 6. Décongélation

Un cryotube est extrait de l'azote liquide et mis à décongeler partiellement dans un bain-marie à 37°C. La suspension cellulaire est reprise dans un milieu de culture complet (milieu de culture + 10% SVF). Après adhésion cellulaire, le milieu de culture est renouvelé.

II. Expression de protéines recombinantes

II. 1. Clonage

1 RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) et digestion d'ADN plasmidique

Les ADN complémentaires des AQP2 et AQP3 de kératinocytes humains ont été obtenus par la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant des amorces et une ADN polymérase. Chaque amorce possède un site de restriction par une enzyme permettant après digestion l'insertion dans le vecteur pEGFP-N1 (Clontech) pour l'AQP3 et le vecteur pmCherry-C1 (Clontech, figure M1) pour l'AQP2. Ces enzymes ne doivent couper le vecteur et la séquence d'AQP qu'une seule fois et permettre l'insertion dans le cadre de lecture. Ces enzymes sont pour l'AQP3 et le vecteur pEGFP-N1, BglII (A/GATCT) et BamHI (G/GATCC) pour l'AQP2 et le vecteur pmCherry, AgeI (A/CCGGT) et MfeI (C/AATTG). Dans le cas AQP3-GFP, la GFP est située à l'extrémité C terminale et pour l'AQP2-Cherry, la Cherry se trouve à l'extrémité N terminale.

2 Electrophorèses en gel d'Agarose

Les produits de digestion, plasmide purifiés et produits de PCR sont séparés par électrophorèse en gel d'Agarose 1% contenant du BET à 50V et 50mA pendant 1h en présence de bleu de charge et révélés sous UV.

3 Purification des fragments d'intérêt

Les fragments d'intérêt sont extraits du gel d'Agarose grâce au Kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel).

4 Ligation

Les produits de digestion sont mélangés et liés par la T4 DNA ligase (NEB) dans un volume final de 20µl contenant le tampon adéquat (T4 DNA Ligase Reaction Buffer, NEB). Un gel contrôle a été fait pour s'assurer que la ligation s'est effectuée. Ce contrôle permet aussi de doser la quantité de produit de ligation à utiliser pour la transformation bactérienne.

5 Transformation Bactérienne

2µl de mélange de ligation est incubé avec 50µl de bactéries thermocompétentes DH5α pendant 20mn sur de la glace. Les bactéries sont transformées par choc thermique, passage de la glace à 37°C pendant 1mn dans un bain-marie et passage à nouveau dans de la glace pendant 5mn. 200µl de milieu LB (Luria-Bertani) sont additionnés au mélange et incubé à 37°C pendant 1h30. Deux étalements sont ensuite réalisés sur du milieu LB agar plus Kanamycine (antibiotique de sélection) 50µg/mL et incubés toute la nuit à 37°C. Dans ces conditions, seules les bactéries ayant intégré le plasmide contenant le gène de résistance à la kanamycine survivent et se multiplient.

6 Purification de plasmide

Les plasmides d'intérêt sont purifiés grâce au kit Nucleobond (Macherey-Nagel), l'ADN est élué dans 35µl d'eau distillée. La qualité de l'ADN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'Agarose.

7 Séquençage

Les plasmides AQP3-GFP et AQP2-Cherry ont été vérifiés par la société Genomes Express.

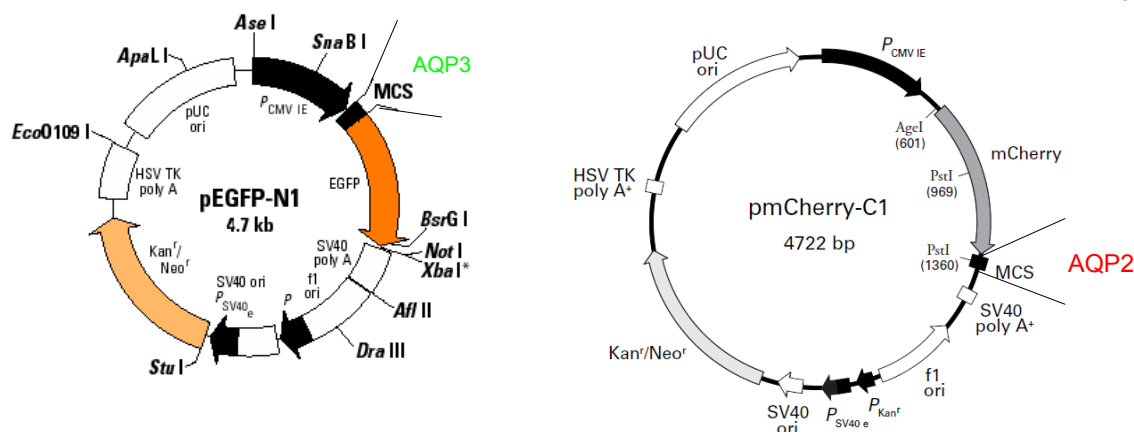


Figure M1. Carte des vecteurs pEGFP-N1 et pmCherry-C1

II. 2. Transfection stable

Les cellules sontensemencées dans une plaque 24 puits de manière à atteindre 70% de confluence au moment de la transfection.

Dans le cas des cellules HaCat, nous avons utilisé comme agent transfectant la lipofectamine et le fugène HD et dans le cas des cellules MDCK, nous avons utilisé uniquement la lipofectamine.

0,4µg de plasmide est ajouté à 50µL de milieu OptiMem (milieu de culture), 1µl de lipofectamine est ajouté à 50µL de milieu OptiMem et enfin 1,25µL de fugène HD est ajouté à 50µL de milieu OptiMem. Nous avons procédé ensuite au mélange plasmide, lipofectamine d'un côté et de l'autre plasmide, fugène HD. Chaque mélange est laissé reposer à température ambiante pendant 20mn. Le mélange est ensuite doucement ajouté à 500µL de milieu DMEM contenu le puits à transfecter et le contenu du puits est homogénéisé.

Le lendemain matin, le milieu est changé et remplacé par 1mL de milieu DMEM complet (avec 10% de SVF) et la fluorescence des cellules est observée. Le jour suivant, les cellules sont trypsinées, diluées au 1/100 et réparties dans des plaques 6 puits. La généticine (G418), antibiotique de sélection est ajoutée au milieu à raison de 1mg/mL pour les cellules MDCK et 1,5mg/mL pour les cellules HaCat. Ensuite à l'aide d'anneaux de clonage, on repique un îlot cellulaire ou une cellule qu'on ensemence à nouveau dans des plaques 6 puits. Lorsque les cellules sont confluentes à 70%, elles sont repiquées dans des boîtes de pétri. L'opération est renouvelée jusqu'à l'obtention d'une lignée stable. A chaque passage, la G418 est toujours rajoutée au milieu de culture, sa concentration est diminuée au fur et à mesure de l'obtention des lignées stables. La G418 est utilisée à 0,5mg/mL lorsqu'on arrive à stabiliser une lignée cellulaire.

Les observations de cellules vivantes fluorescentes se font grâce à un microscope inversé à épifluorescence et les acquisitions d'image grâce à une caméra et un logiciel CoolSNAP (Roper Scientific).

III. Immunolocalisation cellulaire

III. 1. Principe général

Dans la technique d'immunofluorescence indirecte, l'immunomarquage permet de localiser un antigène dans une cellule ou dans un tissu à l'aide d'un anticorps primaire spécifique puis un anticorps secondaire couplé à un fluorophore reconnaissant la région constante Fc de l'anticorps primaire (figure M2). La fluorescence est ensuite détectée grâce à un microscope à épifluorescence ou un microscope confocal. Dans le cas d'une fluorescence directe, la protéine d'intérêt (souvent un anticorps) est fusionnée à une protéine auto-fluorescente (GFP ou DsRed).

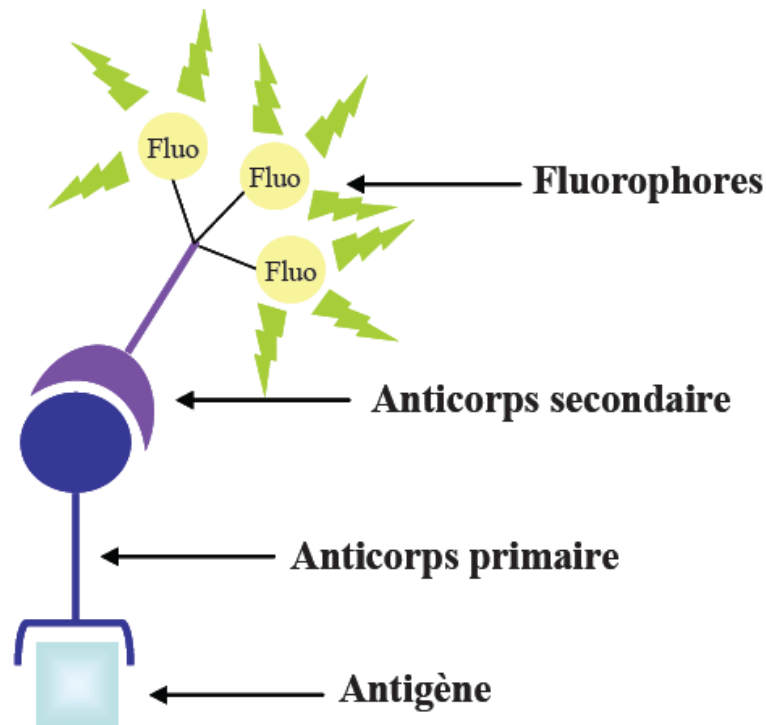


Figure M2. Schéma du principe général de l'immunofluorescence indirecte.

III. 2. Microscope à épifluorescence

Le microscope à épifluorescence est un microscope optique tirant profit du phénomène de fluorescence. La fluorescence est la propriété que possèdent certains corps à émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus haute énergie. La microscopie à épifluorescence repose sur la formation d'une image par détection de cette lumière émise. Le laboratoire dispose d'un microscope à épifluorescence droit: Axio Imager.M1 de Zeiss.

III. 3. Microscope confocal

Le microscope confocal à balayage laser utilise le laser comme source de lumière pour balayer la surface d'intérêt. En microscopie à fluorescence classique, on a une perte de résolution de l'image due à l'excitation de fluorochromes situés en dehors du plan focal. Grâce à la présence d'un diaphragme appelé « pinhole », la microscopie confocale à balayage

laser élimine la lumière provenant des plans défocalisés qui parasitent le plan focal. Elle donne ainsi accès à des informations situées à l'intérieur de la cellule. Nous avons utilisé lors de ce travail un microscope confocal LSM 510 META de Zeiss.

III. 4. Protocole d'immunomarquage

Les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre de 12 mm de diamètre. A confluence, elles sont rincées deux fois au PBS (sans calcium, sans magnésium). Les cellules sont ensuite fixées soit au paraformaldéhyde 4% pendant 20 mn sur de la glace suivi d'une post-fixation au méthanol pendant 30s à -20°C, soit au paraformaldéhyde 4% pendant 20mn à température ambiante. Le choix de la méthode de fixation dépend de l'anticorps utilisé. Les cellules fixées juste au paraformaldéhyde sont perméabilisées avec 0,2% triton X 100 pendant 10mn et la lamelle est saturée avec du tampon de blocage (0,5% BSA dans du PBS contenant 0,1% mM de Ca^{2+} et 2mM de Mg^{2+}). L'incubation successive avec l'anticorps primaire et l'anticorps secondaire nous permet de détecter au niveau cellulaire, le complexe anticorps-antigène fluorescent par l'utilisation d'un microscope à fluorescence après montage lame/lamelle en présence d'un milieu approprié IMMU-MOUNT (Thermo scientific). Entre chaque fixation, perméabilisation et incubation successive d'anticorps, des lavages au PBS (PBS/BSA pour l'anticopr) sont réalisés.

Résultats

I. Régulation de l'adressage de l'aquaporine 3 au cours de la différenciation induite par le calcium dans les cultures primaires de kératinocytes

L'aquaglycéroporine AQP3 a été identifiée pour la première fois dans l'épiderme de rat (Frigeri, Gropper et al. 1995), puis dans l'épiderme de souris (Ma, Hara et al. 2002) et enfin dans l'épiderme humain (Sougrat, Morand et al. 2002).

Comme nous l'avons vu, notre équipe a montré l'expression de l'AQP3 au niveau des kératinocytes de l'épiderme humain (figure E). Sur cette immunolocalisation, nous pouvons voir un marquage intracellulaire de l'AQP3 dans les couches basales et un marquage membranaire dans les couches suprabasales.

Au vu des résultats de Sougrat et en se basant sur la structure de l'épiderme, nous nous sommes posés la question de savoir s'il existe une régulation de l'adressage de l'AQP3 au cours de la différenciation des kératinocytes.

Le calcium est un acteur clé de la différenciation des kératinocytes. Il est présent à travers l'épiderme et est de plus en plus concentré au fur et à mesure que l'on remonte vers les couches supérieures de l'épiderme. L'ajout de calcium dans le milieu de culture induit la différenciation des kératinocytes (Hennings, Michael et al. 1980; Boyce and Ham 1983). Cette technique de différenciation induite par le calcium est souvent utilisée au laboratoire. C'est par ce procédé que l'ARNm de l'AQP9 a été détecté dans les cellules HaCats (Sugiyama, Ota et al. 2001). L'ajout du calcium extracellulaire pendant 24h sur des cultures primaires de kératinocytes murins inhibe l'expression de l'AQP3 (Zheng and Bollinger Bollag 2003). Ce qui est en contradiction avec les résultats obtenus par notre équipe. Car 24h après ajout de calcium extracellulaire sur des cultures primaires de kératinocytes humains, l'expression de l'AQP3 demeure constante (Boury Jamot 2011). Cette contradiction pourrait s'expliquer éventuellement par le fait que ce sont deux modèles cellulaires différents. En effet, l'épiderme murin est beaucoup plus fin que l'épiderme humain et ne possède pas de couche épineuse.

Pour répondre à la question d'une régulation de l'adressage de l'AQP3 au cours de la différenciation des kératinocytes induite par le calcium, nous avons ainsi réalisé une immunolocalisation de l'AQP3 sur des cultures primaires de kératinocytes en présence de

0,05mM et 1,5mM de calcium (figure RI. 1). Les kératinocytes sont cultivés dans du KSFM (Keratinocyte Serum-Free Medium) auquel nous avons ajouté 0,05mM et 1,5mM de calcium. Dans ce but, les kératinocytes sont cultivés pendant 48h.

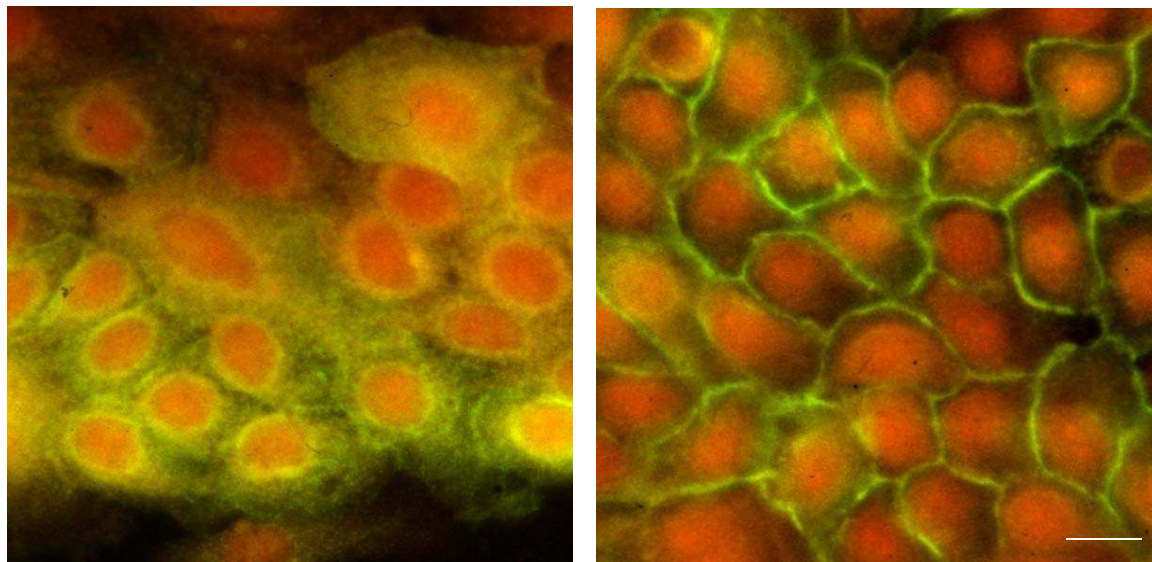


Figure RI. 1. Effet de la différenciation induite par le calcium sur la localisation de l'AQP3 sur des cultures primaires de kératinocytes. (Gauche) 0,05 mM Ca^{2+} localisation intracellulaire. (Droit) 1,5mM Ca^{2+} localisation à la membrane plasmique. Le noyau est coloré à l'orange par l'acridine orange Barre : 10 μm

A 0,05mM de Ca^{2+} extracellulaire, les kératinocytes demeurent en prolifération (Hennings, Michael et al. 1980; Boyce and Ham 1983). Il s'agit d'une condition proche de la concentration de Ca^{2+} au niveau de la lame basale des l'épiderme Dans ces conditions, nous avons une localisation intracellulaire de l'AQP3, marquée en vert grâce à un anticorps anti-AQP3 couplé à un fluorophore FITC. Ce marquage évoque celui du réticulum endoplasmique.

A 1,5mM de Ca^{2+} extracellulaire et après 48h, les kératinocytes sont dans un état différencié. Nous avons une localisation périphérique de l'AQP3, probablement à la membrane plasmique. Nos résultats montrent que l'augmentation de la concentration extracellulaire de Ca^{2+} de 0,05mM à 1,5mM sur des kératinocytes primaires en culture conduit à la translocation de l'AQP3 du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique. Ces observations suggèrent que la localisation de l'AQP3 dans les kératinocytes dépend de leur état de différenciation qui est sous le contrôle du calcium.

II. Résultats des transfections

II. 1. HaCat

Nous venons de montrer que la différenciation induite par le calcium semble réguler l'adressage de l'AQP3 dans les cultures primaires de kératinocytes. La plupart des aquaporines présente habituellement un adressage constitutif à leur membrane cible. Par exemple l'AQP1 est localisée aux membranes plasmiques dans des cellules plus ou moins polarisées telles que l'épithélium ou les cellules rénales (Nielsen, Smith et al. 1993; Maunsbach, Marples et al. 1997). Dans les cellules épithéliales du rein, l'AQP3 et l'AQP4 sont également aux membranes plasmiques (Ecelbarger, Terris et al. 1995). Cependant, d'autres aquaporines comme l'AQP2 présentent un trafic intracellulaire régulé. Ainsi dans le rein, l'AQP2 se trouve dans des vésicules intracellulaires au repos, mais sont adressées à la membrane plasmique apicale des cellules épithéliales en réponse à l'hormone antidiurétique (Fig. A.V.3, Nielsen, Smith et al. 1993; Nielsen, Frokiaer et al. 2002; Takata, Matsuzaki et al. 2004; Morishita, Matsuzaki et al. 2005)

A ma connaissance, aucune étude ne s'est encore intéressée à l'effet du calcium sur l'adressage de l'AQP3 dans les cellules ou tissus. C'est pourquoi nous avons voulu comparer le trafic intracellulaire de l'AQP3 en réponse à la différenciation induite par le calcium à celui de l'AQP2. Pour ce faire, nous avons décidé de réaliser des constructions de protéines fluorescentes et d'obtenir des clones stables. L'obtention de clones stables nous permettrait d'étudier les phénomènes de différenciation (72 heures) et nous assure que tout changement de localisation observé est bien dû à un changement de localisation des protéines étudiées et non à un artéfact de la transfection transitoire.

Pour cette étude, nous avons choisi les cellules HaCats. Ce sont des cellules immortalisées de kératinocytes humains qui ont la capacité de garder un pouvoir de différenciation (Boukamp, Petrussevska et al. 1988).

Afin de visualiser l'adressage de l'AQP3 et de l'AQP2, nous avons construit des clones exprimant des protéines de fusion AQP3-GFP (fluorescence verte) et AQP2-Cherry (fluorescence rouge). Cette différence de fluorescence nous permettra éventuellement de suivre facilement dans une même cellule l'adressage de ces deux aquaporines.

Les cellules Hacats sont transfectées comme décrit dans la partie matériels et méthodes. La transfection de cellules Hacat par le vecteur AQP3-GFP fonctionne puisque le lendemain, on observe environ 40% de cellules transfectées (figure RII .1). Néanmoins, le marquage observé n'est pas celui qu'on attendait (réticulum endoplasmique ou membrane plasmique).

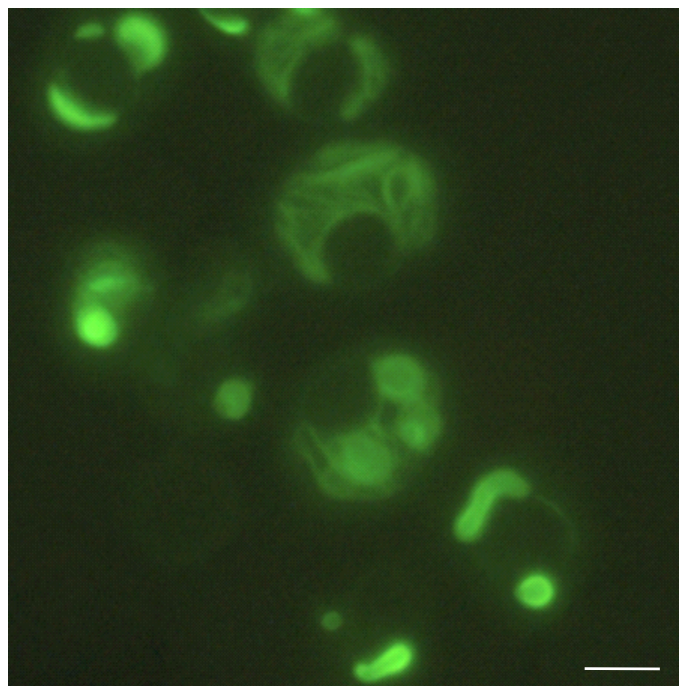


Figure RII. 1. Observation des cellules HaCat transfectées avec l'aquaporine 3 au microscope à fluorescence: Présence d'OSER. Barre : 10µm

La fluorescence observée concerne plutôt des structures annulaires ou sphériques typiques. Ce marquage que nous avons observé est comparable à celui observé plutôt par Snapp et al, 2003. Ces structures annulaires ou sphériques typiques portent le nom de OSER (Organized Smooth Endoplasmic Reticulum) (Snapp, Hegde et al. 2003). Ce sont des enroulements de membrane du réticulum causés par l'oligomérisation de protéines membranaires enchâssées dans la membrane du réticulum endoplasmique (figure RII. 2).

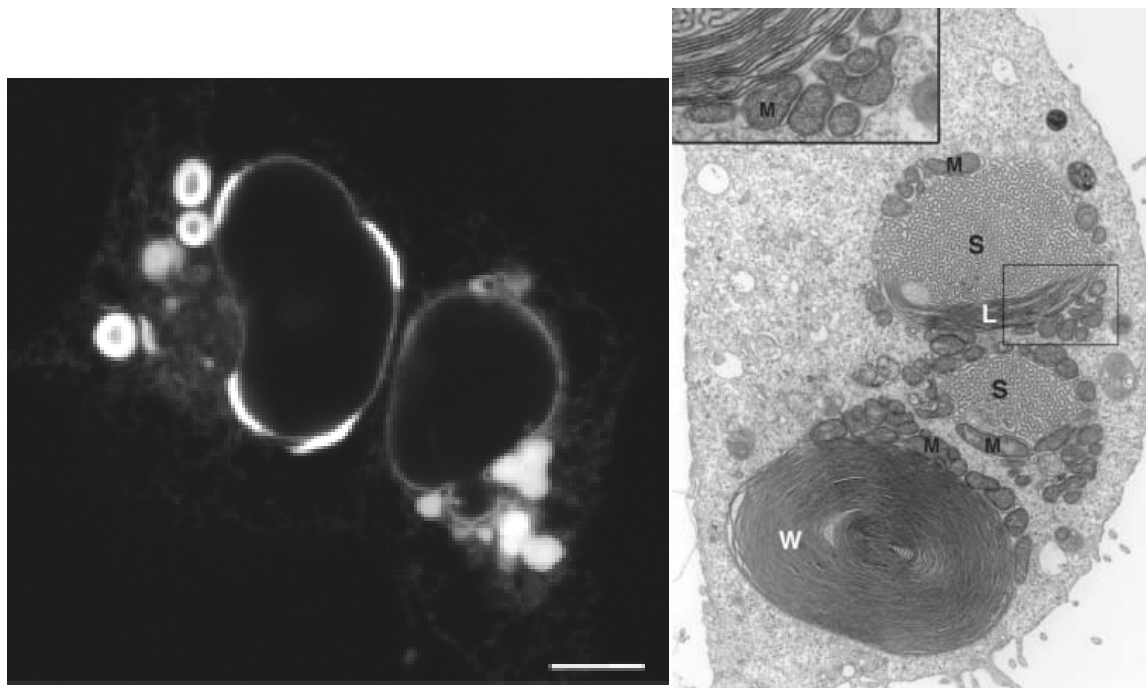


Figure RII. 2. Observation de OSER dûs à la dimérisation d'une protéine fusionnée à la GFP. Snapp et al, 2003. (Gauche) en microscopie à fluorescence. (Droit) en microscopie électronique (M : mitochondries, S et W : OSER)

Snapp et al, ont montré au cours de leurs travaux que la surexpression de protéines résidentes du réticulum endoplasmique telles que le cytochrome b5, Sec61 γ et du cytochrome P 450 seule ou fusionnée à la GFP conduisait à la formation d'OSER (Snapp, Hegde et al. 2003). Ces auteurs ont remarqué que la GFP à elle seule était capable d'induire la formation d'OSER, lorsqu'ils ont remplacé complètement le domaine cytoplasmique du cytochrome b5 par la GFP. En effet la structure cristallographique de la GFP montre qu'elle peut se dimériser dans une orientation antiparallèle (Yang, Moss et al. 1996). C'est cette dimérisation de la GFP qui est à l'origine de la formation d'OSER. On peut obtenir une GFP monomérique en réalisant une mutation ponctuelle d'un acide aminé parmi trois. Cette mutation n'altère en rien les propriétés de fluorescence de la GFP (Zacharias, Violin et al. 2002).

Nous avons résolu ce problème d'OSER en remplaçant la GFP dimérique par une GFP monomérique obtenue par mutagenèse dirigée en remplaçant la leucine 221 par la lysine comme l'avait fait Snapp et coll dans leurs travaux (Snapp, Hegde et al. 2003).

Que ce soit avec l'AQP3-GFP ou l'AQP2-cherry, nous avons obtenu une faible efficacité de transfection environ 30% (figure RII. 3). La sélection visant à obtenir des clones stables est aussi d'une faible efficacité car après ajout de l'antibiotique de sélection G418 (1mg/mL) et au bout de deux passages, nous avons vu que les cellules fluorescentes se divisent peu ou pas et qu'il y a également des cellules fluorescentes mortes. Finalement après trois ou quatre passages, toute la fluorescence disparaît alors qu'il existe encore des cellules non fluorescentes.

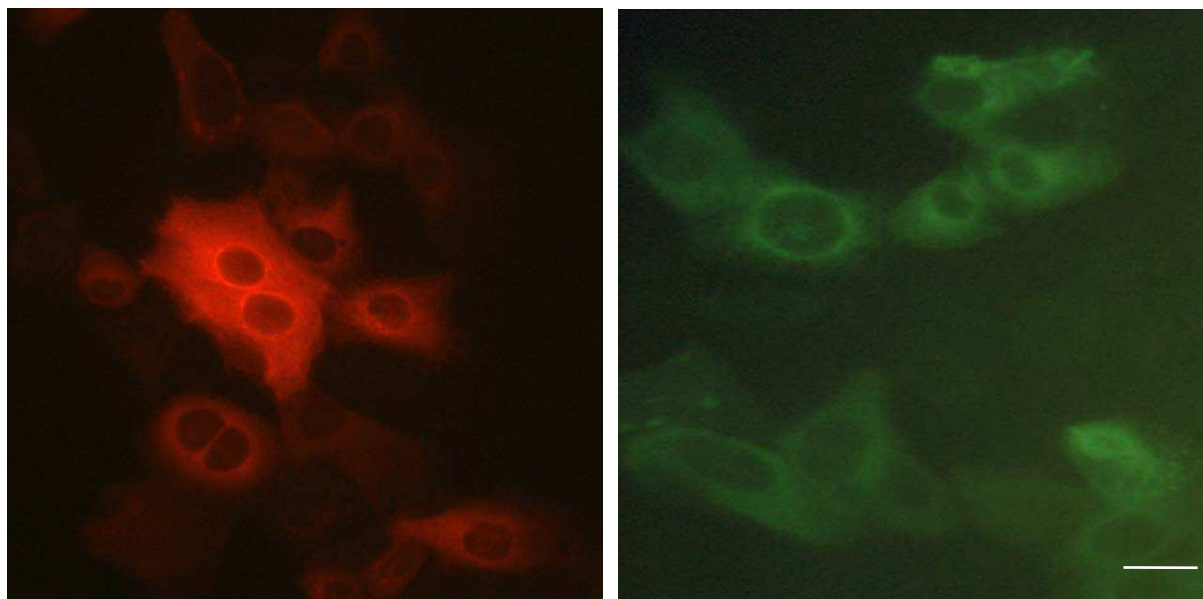


Figure RII. 3. Observation des cellules HaCat transfectées avec les aquaporines 2 et 3 au microscope à fluorescence. (Gauche) HaCat AQP2-Cherry. (Droit) HaCat AQP3-GFP. Barre : 10µm

Dans le but d'optimiser l'efficacité de transfection et obtenir par la suite des clones stables, nous avons testé plusieurs approches:

1- Nous avons diminué le nombre de cellules (de 50%) avant de procéder à la transfection et augmenté la quantité de G418 (1,5mg/mL). Cette tentative s'est soldée par un échec, mais nous a permis au moins d'augmenter un peu l'efficacité de transfection (environ 40%).

2- En plus de la condition initiale, nous avons multiplié la quantité d'ADN par deux (0,8µg), ceci nous a permis d'augmenter au moins la durée de vie des cellules fluorescentes.

3- En combinant les deux premières conditions, nous avons divisé la quantité de lipofectamine par deux (0,5µL). Cette tentative a connu une petite réussite puis qu'au bout de deux semaines de sélection, nous avons encore des cellules fluorescentes. Cependant, nous n'avons pas pu obtenir de clones stables car toutes les cellules fluorescentes ont encore disparu et il restait des cellules non fluorescentes vivantes malgré la présence de la G418.

4- Dernièrement, nous avons changé d'agent transfectant (lipofectamine) et pris le Fugène HD qui est moins toxique pour les cellules. Avec ce nouvel agent transfectant, nous avons repris le test des conditions deux et trois. Nous n'avons pas obtenu une différence significative au niveau des résultats par rapport aux conditions testées avec la lipofectamine.

Après donc de maintes expériences, nous n'avons pas pu obtenir de clones stables AQP3-GFP ou AQP2-Cherry avec les cellules HaCats.

Nous apporterons quelques éléments de réponse afin d'expliquer ce qui s'est passé dans la discussion.

II. 2. MDCK

Nous avons donc décidé de changer de modèle cellulaire. Nous avons fait de nouvelles tentatives avec des cellules MDCK qui sont non seulement une lignée cellulaire dans laquelle les aquaporines sont fréquemment étudiées, mais qui présente aussi l'avantage d'être facile d'utilisation pour réaliser des transfections stables. Outre ces avantages, nous avons d'autant plus choisi les cellules MDCK car d'une part comme notre modèle initial (cellules HaCat), ce sont des cellules épithéliales et d'autre part, elles proviennent du rein de chien où le trafic de l'AQP2 a été étudié et qui nous servira de comparaison avec celui de l'AQP3.

La transfection des cellules MDCK avec les vecteurs AQP3-GFP et AQP2-Cherry est beaucoup plus efficace que dans le cas des cellules HaCats avec environ 80% de cellules fluorescentes après 18h de transfection. Après deux semaines de sélection, des colonies constituées uniquement de cellules fluorescentes sont visibles grâce au microscope à épifluorescence dans chacune des boîtes de pétri (figure RII. 4).

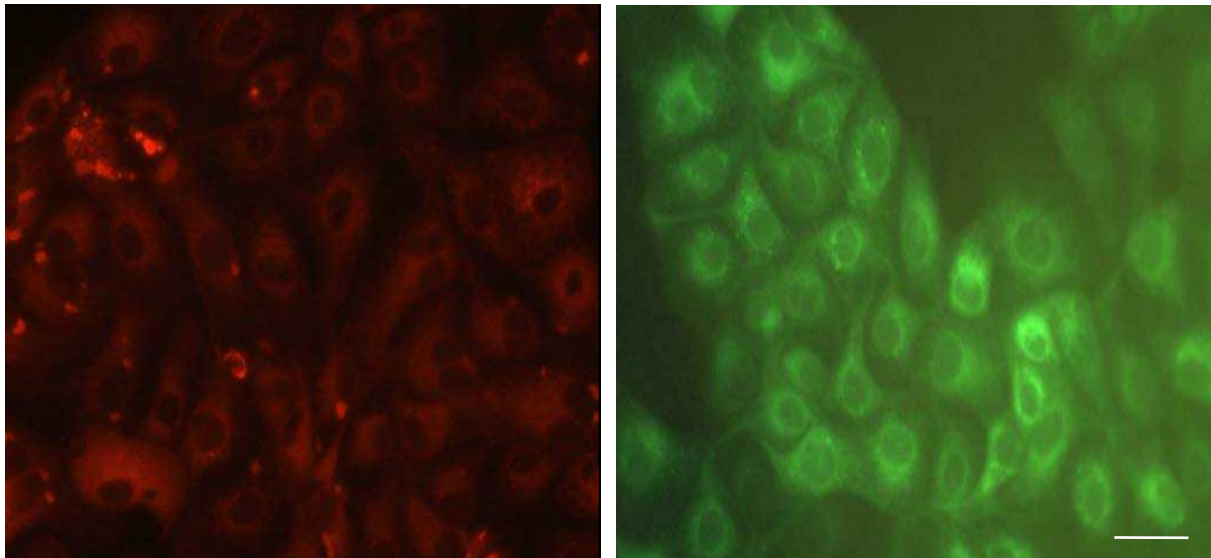


Figure RII. 4. Transfections transitoires MDCK AQP2-Cherry et MDCK AQP3-GFP. (Gauche) MDCK AQP2-Cherry. (Droit) MDCK AQP3-GFP. Observations au microscope à fluorescence. Barre : 10µm

Ces colonies sont isolées grâce à des anneaux de clonage et sont réparties dans des plaques 6 puits. On obtient ainsi plusieurs clones d'intensité de fluorescence différente. Ces cellules sont ensuite ensemencées dans des boîtes de pétri jusqu'à l'obtention de cellules uniformément fluorescentes. La sélection par la G418 visant à obtenir des clones stables de cellules exprimant une AQP3-GFP et une AQP2-Cherry a donc réussi dans le cas des cellules MDCK à l'inverse des cellules HaCats (figure RII. 5)

II. 2. 1. Localisation subcellulaire de l'AQP2 et de l'AQP3 dans des cellules MDCK

24h après la transfection des cellules MDCK (transfection transitoire) par l'AQP2-cherry ou de l'AQP3-GFP, on observe une localisation intracellulaire des protéines. La localisation subcellulaire des deux protéines est peu différente (figure RII. 4) : il s'agit d'une localisation périnucléaire qui s'étend dans toute la cellule et évoque le réticulum endoplasmique. A ce stade, il est probable que l'observation correspond à une surexpression importante des protéines fluorescentes dans les cellules positives. Ces protéines membranaires sont alors fortement exprimées dans le réticulum endoplasmique. Ceci explique d'ailleurs la formation d'OSERs lorsque la forme dimérique avait été utilisée.

En transfection stable, après plusieurs jours/semaines de cultures, les cellules sont d'abord dans un état différencié et en plus, nous avons un meilleur signal dû en partie au fait que nous avons utilisé un microscope confocal. Dans ce cas, la protéine AQP3-GFP est localisée à la membrane plasmique (figure RII. 5). La protéine AQP2-Cherry présente toujours une localisation intracellulaire en transfection stable (figure RII. 5).

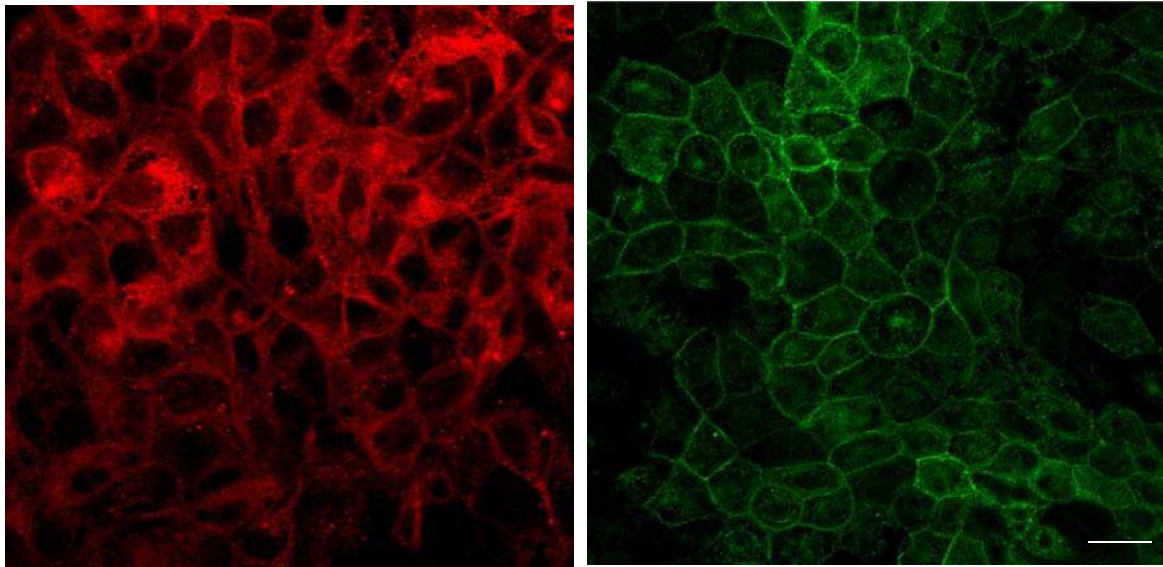


Figure RII. 2. Clones stables de cellules MDCK. (Gauche) MDCK AQP2-Cherry. (Droit) MDCK AQP3-GFP. Observations au microscope confocal. Barre : 10µm

Que ce soit en transfection transitoire ou en transfection stable, l'AQP2-cherry a une localisation intracellulaire. C'est le résultat auquel nous nous attendions car l'AQP2 n'est attendu à la membrane plasmique que suite à sa phosphorylation par la PKA en réponse à une augmentation du l'Adénosine Monophosphate cyclique (AMPc) intracellulaire.

III. Effets du calcium sur l'adressage et sur la localisation des aquaporines dans les cellules MDCK

Nous avons montré que le calcium semble réguler l'adressage de l'AQP3 dans les cultures primaires de kératinocytes. A faible concentration de calcium, l'AQP3 a une localisation intracellulaire et à forte concentration de calcium, elle est localisée à la membrane plasmique (figure RI. 1).

III.1 Effets du calcium sur l'adressage de l'aquaporine 3 et de l'aquaporine 2 sur les cellules MDCK

Comme nous l'avons vu précédemment, nous avons obtenu des clones stables avec les cellules MDCK et non avec les cellules HaCats contrairement à ce qui avait été espéré. Ainsi, la deuxième partie de mon projet concernant la régulation de l'adressage de l'AQP3 et de l'AQP2 ainsi que le suivi de la dynamique d'adressage de ces protéines a été réalisée uniquement avec ce modèle cellulaire.

Pour réaliser cette étude, nous avons procédé de la manière suivante:

La veille, les cellules (MDCK AQP3-GFP) ont été trypsinées puis réparties équitablement (10^5 cellules/puits de 16,2 mm de diamètre) dans des plaques 24 puits avec un milieu de culture DMEM normal qui contient du calcium (2,8mM de Ca^{2+}). Dans ce contexte, l'AQP3 a une localisation intracellulaire.

Le lendemain, les cellules sont rincées trois fois au PBS. Le milieu DMEM est changé par un autre milieu de culture EMEM qui ne contient pas de calcium.

Au milieu EMEM, nous avons immédiatement rajouté du calcium à la concentration finale de 0,15mM ou de 1,5mM comme dans les travaux de Hara-Chikuma (2008). Une première cinétique sur 24h et 48h a été faite.

24H après passage des cellules dans le milieu EMEM, nous observons, à 0,15mM de Ca^{2+} , une localisation intracellulaire de l'AQP3. A 1,5mM de Ca^{2+} , l'AQP3 a une localisation intracellulaire mais se retrouve aussi à la membrane plasmique (figure RIII. 1 a et b)

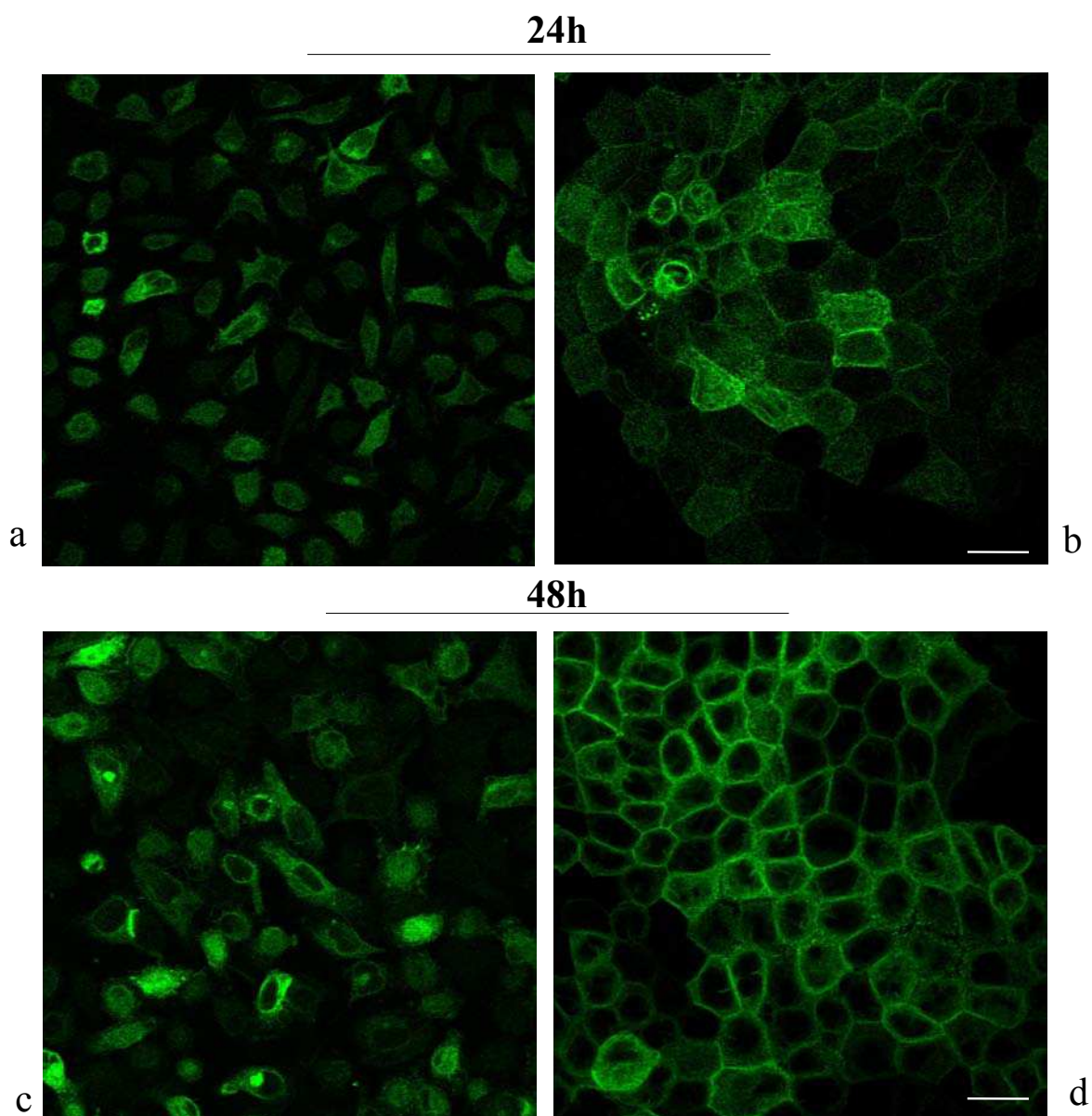


Figure RIII. 1. Régulation de l'adressage de l'AQP3 dans les cellules MDCK. Cellules traitées pendant 24h à 0,15 mM Ca^{2+} (a) localisation intracellulaire et à 1,5mM Ca^{2+} (b) localisation intracellulaire et membranaire. Cellules traitées pendant 48h à 0,15 mM Ca^{2+} (c) localisation intracellulaire et à 1,5mM Ca^{2+} (d) localisation à la membrane plasmique. Barre : 10 μm

48H après passage des cellules dans le milieu EMEM, nous avons toujours, à 0,15mM de Ca^{2+} , une localisation intracellulaire de l'AQP3 alors qu'à 1,5mM de Ca^{2+} elle est localisée à la membrane plasmique (figure RIII. 1 c et d).

Il ressort de ces résultats que dans les cellules MDCK, l'adressage de l'AQP3 est dépendant de la concentration de calcium extracellulaire, ainsi que du temps de traitement. C'est un phénomène plutôt lent car il n'est pas complet à 24h. Signalons toutefois qu'une augmentation de la concentration du Ca^{2+} (2,8mM cas du DMEM), n'influe pas sur la cinétique observée. Nous pouvons supposer qu'il existe un seuil de calcium extracellulaire, compris entre 0,15mM et 1,5mM, responsable de l'adressage de l'AQP3. Sachant que la concentration intracellulaire en calcium est de 100nM et celle dans le réticulum endoplasmique est de 100μM, ce seuil de concentration est donc 10 fois la concentration à l'intérieur du RE et de 10000 fois celle à l'intérieur de la cellule.

Il serait intéressant de connaître la mesure exacte du calcium intracellulaire à partir de laquelle on a un adressage de l'AQP3 à la membrane plasmique. On pourrait pour cela utiliser des sondes fluorescentes comme le Fura-2, l'Indo-1 ou le Quin-2.

Ainsi le modèle expérimental que nous avons développé (AQP3-GFP dans des cellules MDCK), semble reproduire le comportement observé dans les cultures primaires de kératinocytes (Sougrat, Morand et al. 2002).

Afin d'étudier la spécificité de l'adressage de l'AQP3 et de comparer les voies de signalisations et les cinétiques, nous avons étudié dans des conditions identiques, l'effet du calcium sur l'adressage de l'AQP2-Cherry (figure RIII. 2).

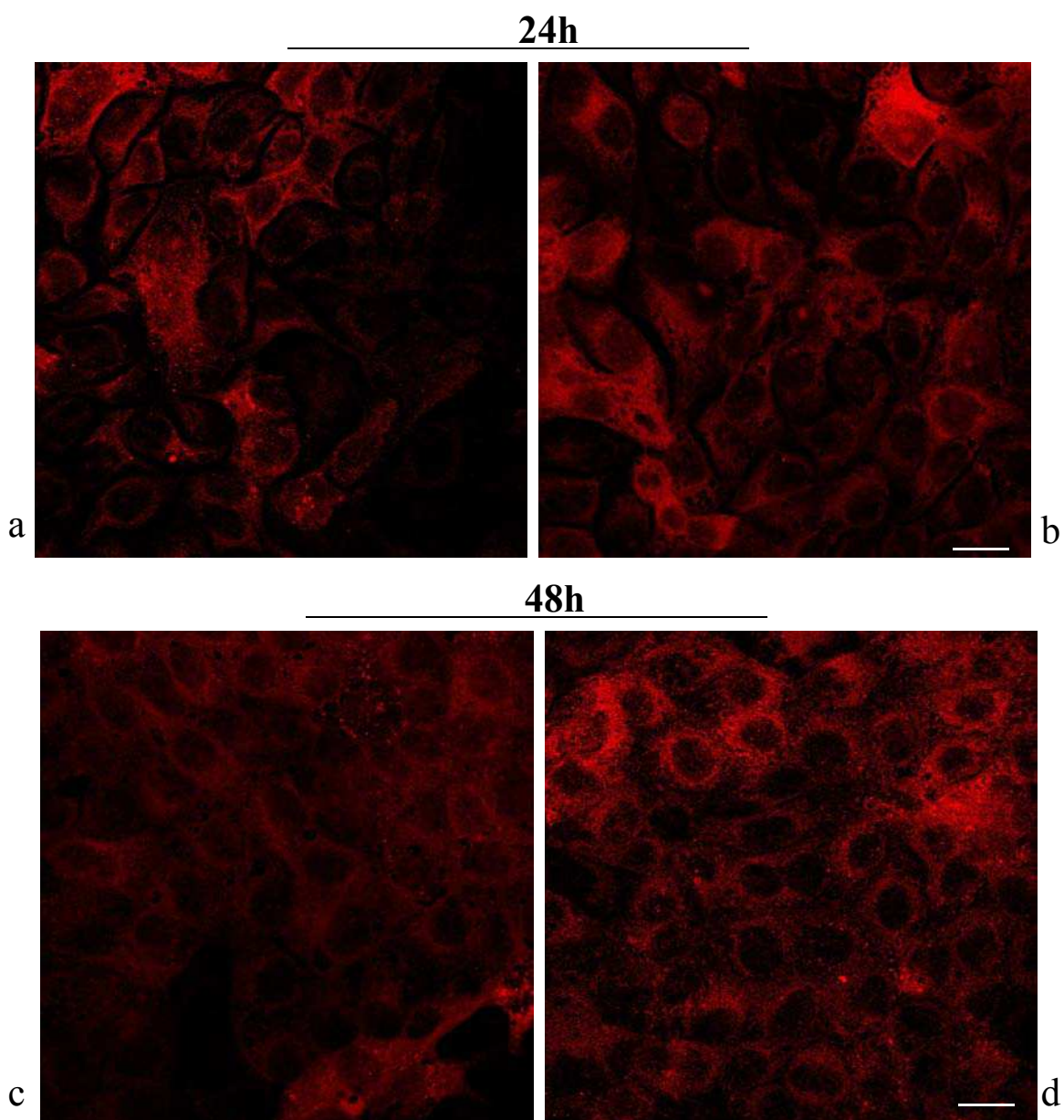


Figure RIII. 2. Effet du calcium sur l'adressage de l'AQP2 dans les cellules MDCK. Cellules traitées pendant 24h à 0,15 mM Ca^{2+} (a) et à 1,5mM Ca^{2+} (b) localisation intracellulaire. Cellules traitées pendant 48h à 0,15 mM Ca^{2+} (c) et à 1,5mM Ca^{2+} (d) localisation intracellulaire. Barre : 10 μm

Aussi bien à 24h qu'à 48h et ceci quelle que soit la concentration du Ca^{2+} , l'AQP2-Cherry présente toujours une localisation intracellulaire dans les cellules MDCK. En somme, le calcium n'a aucun effet sur l'adressage de l'AQP2 dans les cellules MDCK. Ainsi, l'effet du calcium sur l'adressage des aquaporines aux membranes plasmiques n'est pas ubiquitaire. Il

pourrait être intéressant d'examiner cet effet sur d'autres aquaporines résidentes de la membrane plasmique, comme l'AQP1.

III. 2 Identification des compartiments cellulaires de l'aquaporine 3 et de l'aquaporine 2 dans les cellules MDCK

Dans le but de savoir quelle est la compartimentation cellulaire exacte de l'AQP3 et de l'AQP2 dans les conditions étudiées précédemment (faible et forte concentration de calcium), nous avons réalisé des expériences de double marquage avec divers marqueurs de compartiments cellulaires à savoir: Protein Disulfide Isomerase (PDI), Inositol Triphosphate Receptor (RIP3) qui sont des marqueurs du réticulum endoplasmique, cis-Golgi matrix protein (GM130), un marqueur du compartiment cis-Golgien et Zonula Occludens (ZO-1) qui un marqueur de jonctions serrées situé au niveau de la membrane plasmique.

✓ Compartiment cellulaire (réticulum endoplasmique) et AQP3-GFP/ AQP2-Cherry

La figure RIII. 3 illustre un double marquage de l'AQP3-GFP (vert) et PDI ou RIP3 (rouge) qui sont des marqueurs du réticulum endoplasmique dans des cellules MDCK cultivées à une concentration extracellulaire de 0,15mM de Ca^{2+} .

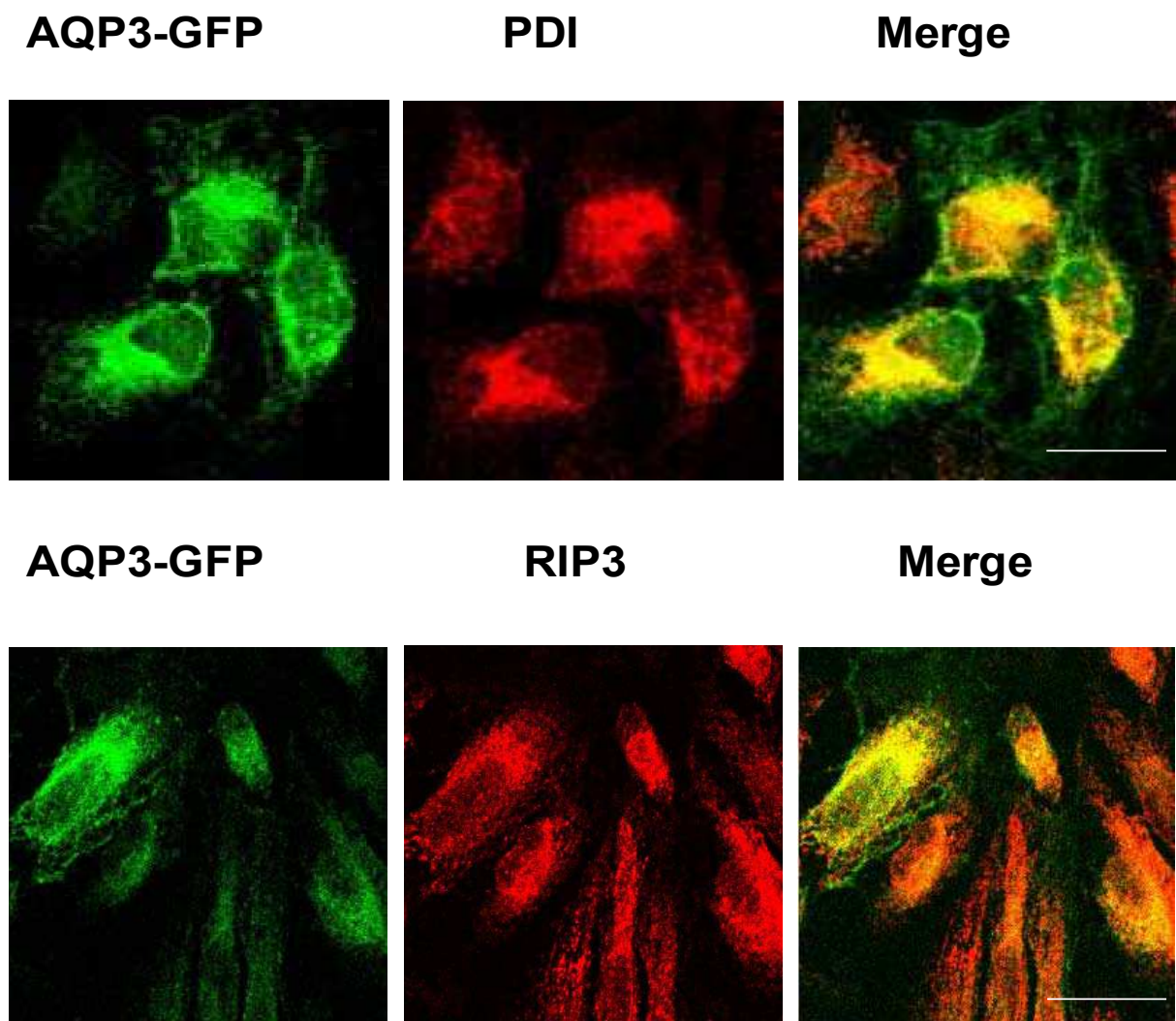


Figure RIII. 3. Effets du calcium sur la localisation de l'AQP3 dans les cellules MDCK. Cellules traitées pendant 24h avec 0,15mM Ca^{2+} . (Haut) PDI et (bas) RIP3 marquage en rouge (marqueurs du RE). Barre : 30 μm

24h après traitement à 0,15mM de Ca^{2+} , l'AQP3 présente une localisation intracellulaire et colocalise assez largement avec PDI et RIP3 (figure RIII.3).

48h après traitement à 1,5mM de Ca^{2+} , l'AQP3 a une localisation membranaire périphérique et ne colocalise pas avec PDI ni RIP3 (figure RIII. 4).

Ainsi, la localisation de l'AQP3 dans le réticulum endoplasmique à faible concentration de Ca^{2+} extracellulaire semble confirmée. A 1,5mM de Ca^{2+} , l'AQP3 n'est pas localisée au niveau du réticulum endoplasmique, mais semble se situer à proximité des membranes plasmiques (figure R.III. 4).

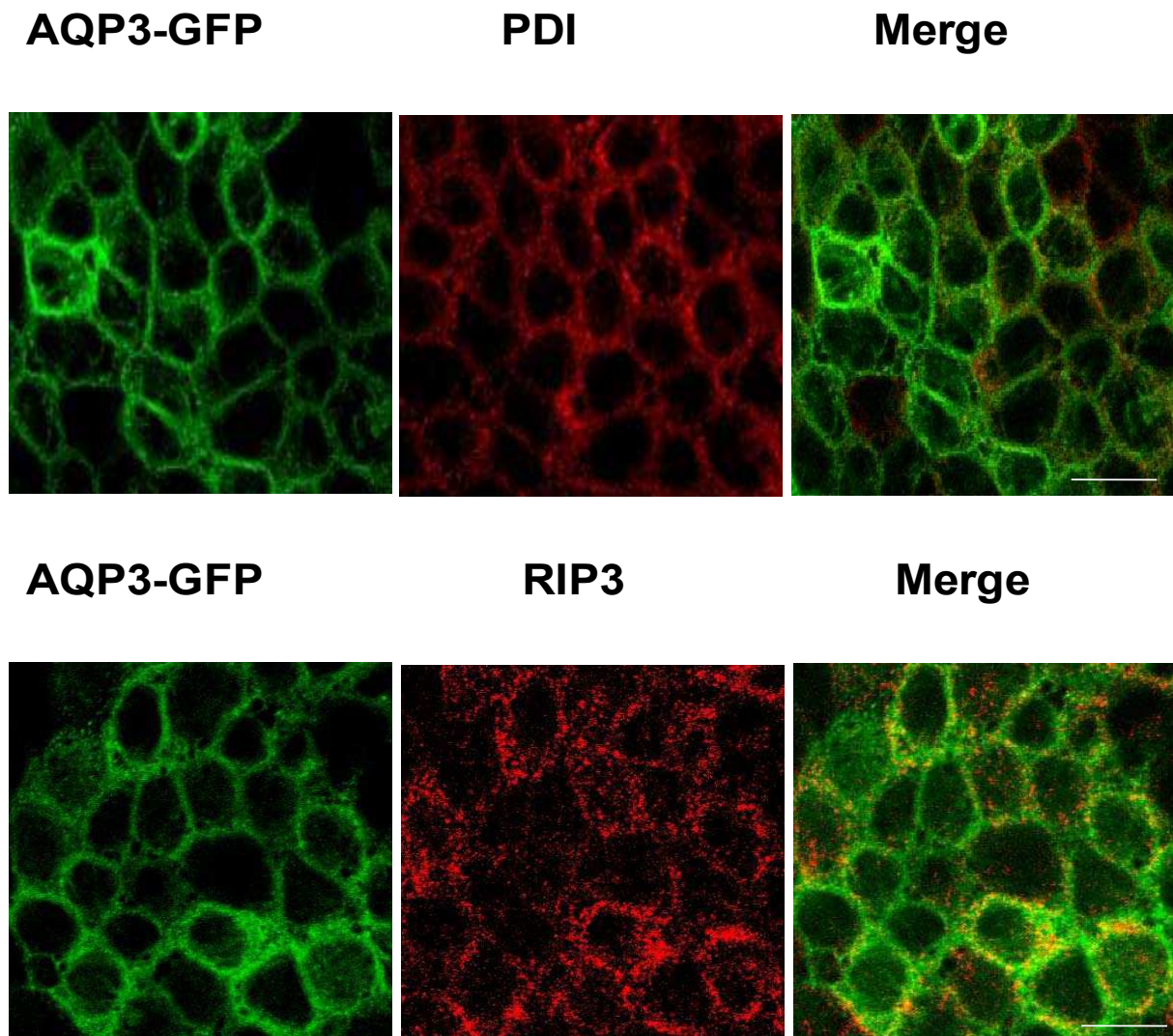


Figure RIII. 4. Localisation subcellulaire de l'AQP3-GFP dans les cellules MDCK :
Double marquage avec RE. Cellules traitées pendant 48h avec 1,5mM Ca^{2+} . (Haut) PDI et (bas)
 RIP3 marquage en rouge (marqueurs du RE). Barre : 20 μm

Remarquons cependant que les protéines PDI et RIP3 ont aussi une distribution cellulaire différente à 0,15mM et à 1,5mM de Ca^{2+} . En effet à 0,15mM de Ca^{2+} , les cellules sont relativement étalées, RIP3 et PDI sont clairement intracellulaires. A 1,5mM de Ca^{2+} , les cellules confluentes sont plus resserrées et la distribution cellulaire de RIP3 et PDI semble d'avantage périphérique. Cette différence de distribution cellulaire est probablement due au changement de la morphologie des cellules suite à une augmentation du calcium extracellulaire. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par (Colosetti, Tunwell et al.

2003). Dans leurs travaux, ces auteurs ont montré que la distribution cellulaire de RIP3 évolue suivant la polarité cellulaire. Dans une cellule non polarisée, RIP3 est localisée dans le réticulum endoplasmique, mais se retrouve à proximité de la membrane plasmique dans le cas de cellule polarisée. Ces auteurs ont cependant également conclu que ce changement de localisation est spécifique à RIP3 et n'a pas été observé pour la majeure partie des protéines du réticulum endoplasmique. Or, nous venons justement de voir que PDI, une autre protéine du réticulum endoplasmique reproduit le même changement de localisation que RIP3. Nous ne savons pas cependant si ces deux protéines (RIP3 et PDI) ont exactement la même localisation.

La figure RIII. 6 représente un double marquage de l'AQP2-Cherry (rouge) et PDI (vert) à 0,15mM de Ca^{2+} .

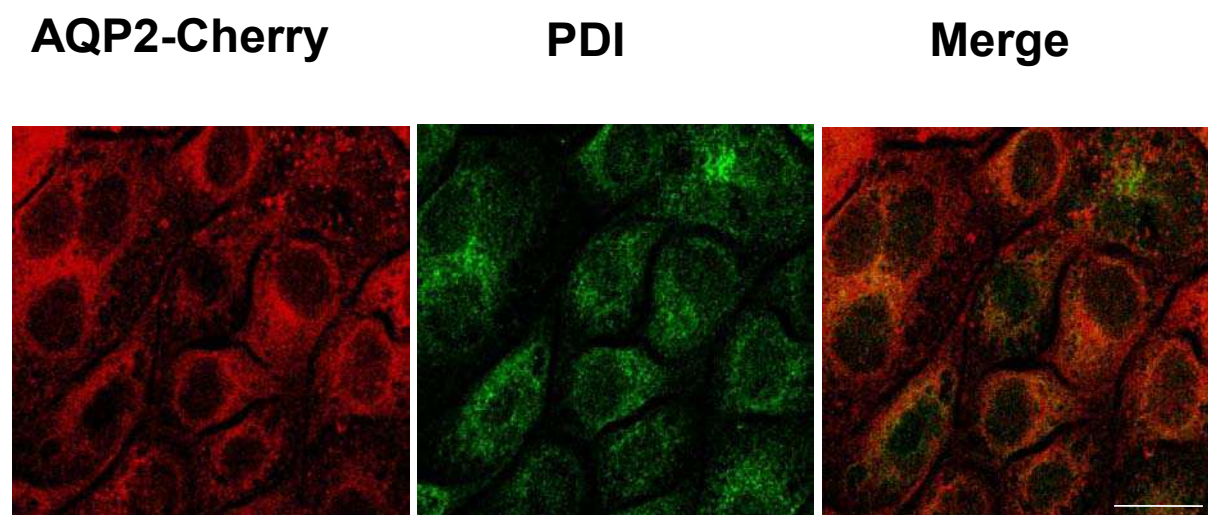


Figure RIII. 6. Localisation subcellulaire de l'AQP2-Cherry dans les cellules MDCK : Double marquage avec le RE. Cellules traitées pendant 24h avec 0,15mM Ca^{2+} . PDI marquage en vert. Barre:20 μm

Comme montré précédemment, l'AQP2 présente une localisation intracellulaire et ne colocalise pas avec PDI (figure RIII. 6). Contrairement à l'AQP3, l'AQP2 n'est donc pas localisée au niveau du réticulum endoplasmique.

✓ Compartiment cellulaire (appareil de Golgi) et AQP3-GFP/ AQP2-Cherry

Afin de préciser la localisation subcellulaire de l'AQP2 dans ces conditions, nous avons souhaité tester un autre marqueur de compartiment cellulaire tel que l'appareil de Golgi. L'appareil de Golgi est divisé en trois compartiments: cis, médian et trans. Nous disposons au laboratoire d'un marqueur du compartiment cis-golgien (GM130). Nous avons ainsi réalisé un double marque de l'AQP2-Cherry (rouge) et de GM130 (vert) (figure RIII. 7).

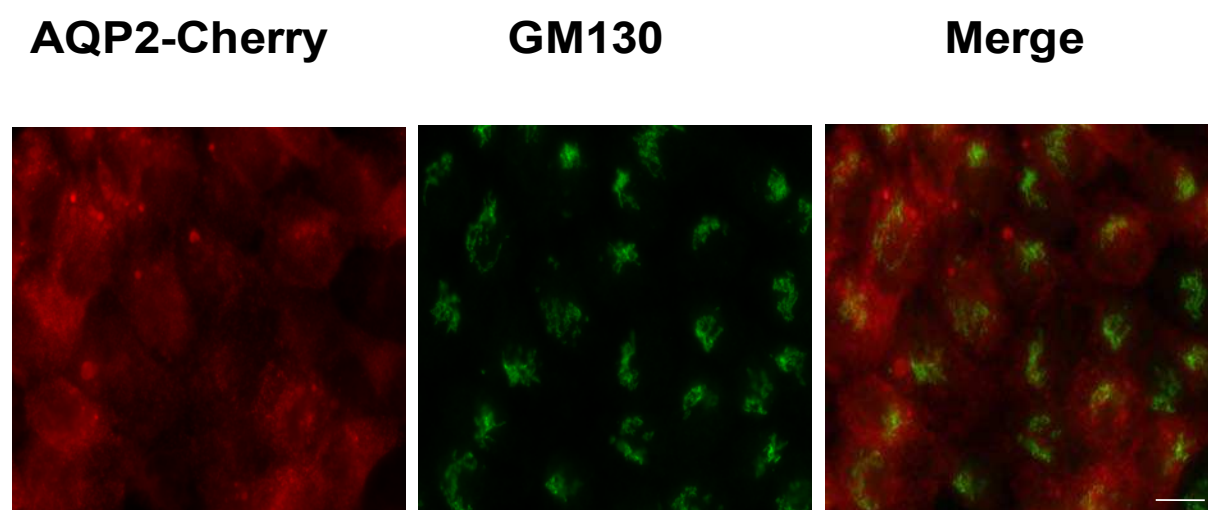


Figure RIII. 7. Localisation subcellulaire de l'AQP2-Cherry dans les cellules MDCK: Double marquage avec le cis-Golgi. Cellules traitées avec 0,15mM Ca^{2+} . GM130 marquage en vert (marqueur du cis-Golgi). Barre :10 μm

L'AQP2 ne colocalise pas avec GM130. Donc, elle n'est pas non plus localisée dans le compartiment cis-golgien (figure RIII. 7). Sa distribution cellulaire est assez distincte de celle de l'appareil de Golgi.

Nos résultats montrent qu'aussi bien à faible concentration de calcium, l'AQP2 a toujours une localisation intracellulaire et n'est située ni au niveau du réticulum endoplasmique, ni au niveau du compartiment cis-Golgien. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par Gustafson et coll, 1998; Tajika et coll, 2002 et Tajika et coll, 2006. Afin de préciser la localisation intracellulaire de l'AQP2, nous aurions du tester d'autres marqueurs de

compartiment cellulaire tel que le marqueur du compartiment trans-golgien (TGN38) ou les marqueurs des endosomes (EAA1, endosomes précoces, TfR, endosomes de recyclage). En principe, l'AQP2 est attendue dans des vésicules intracellulaires spécifiques (Takata 2006) et nos résultats sont conformes à cette hypothèse.

Réciproquement, nous avons décidé de voir si une fraction de l'AQP3 se retrouve localisée dans le compartiment cis-golgien lorsque les cellules sont traitées avec 0,15mM et 1,5mM de Ca^{2+} . La figure R.III. 8 représente un double marquage de l'AQP3-GFP (vert) et du marqueur de cis-Golgi GM130 (rouge) aux deux concentrations. Dans les deux cas, la localisation intracellulaire de l'AQP3 est elle aussi assez distincte du cis-Golgi.

A 0,15mM de Ca^{2+} , il existe une colocalisation partielle, à cette résolution, probablement dues à la grande proximité du réticulum endoplasmique et du cis-Golgi. A 1,5mM de Ca^{2+} , l'AQP3 a une localisation périphérique et ne colocalise pas du tout avec GM130 (figure R.III. 8).

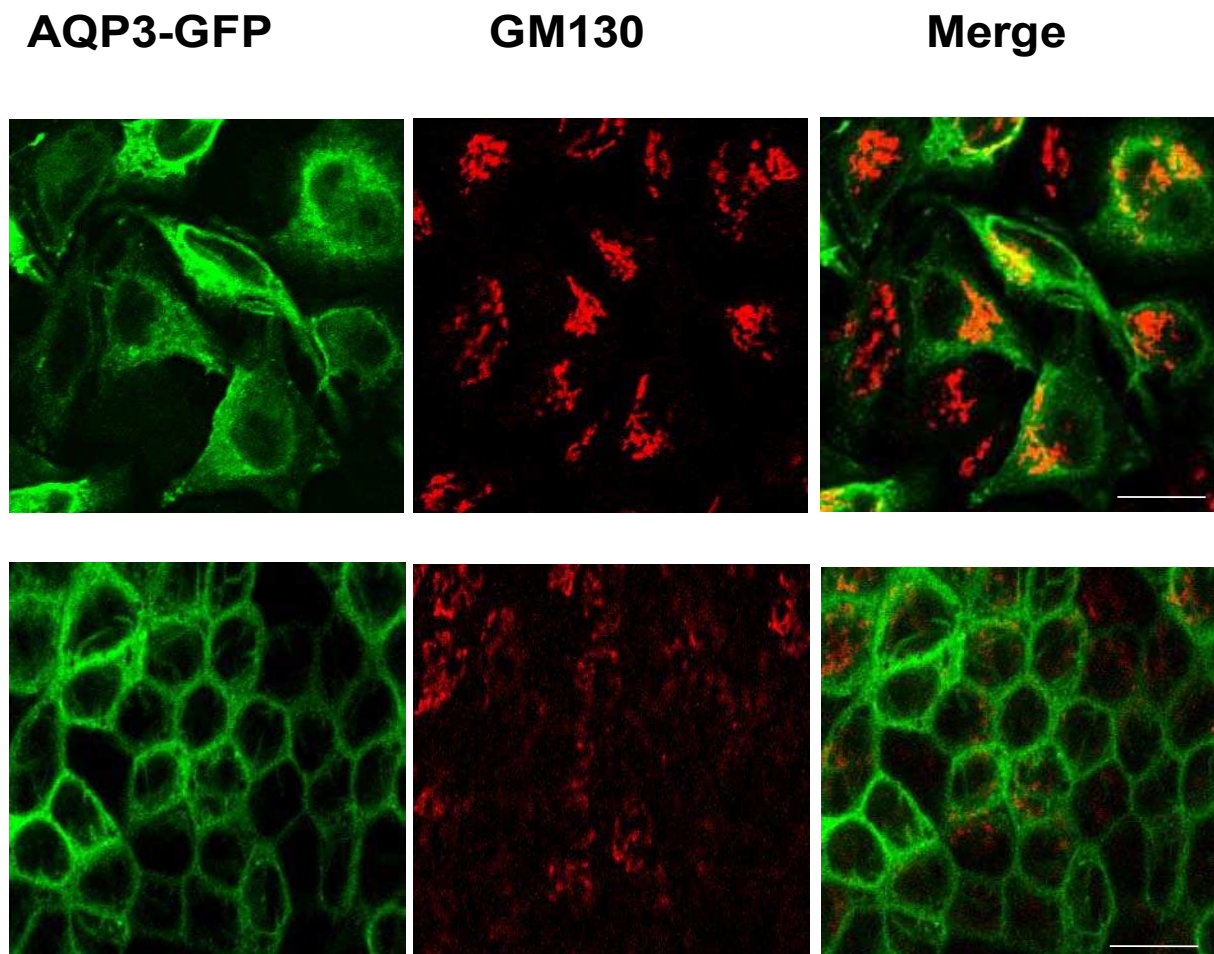


Figure RIII. 8. Localisation subcellulaire de l'AQP3-GFP dans les cellules MDCK:
Double marquage avec le cis-Golgi. Cellules traitées avec 0,15mM Ca^{2+} (haut). Cellules traitées avec 1,5mM Ca^{2+} (bas). GM130 marquage en rouge (marqueur du cis-Golgi). Echelle : 20 μm

✓ Compartiment cellulaire (membrane plasmique) et AQP3-GFP/ AQP2-Cherry

A 1,5mM de Ca^{2+} , l'AQP3 semble être adressée aux membranes plasmiques. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé ZO-1, un marqueur des jonctions serrées situé au niveau des membranes plasmiques latérales. La figure RIII. 9 présente ainsi un double marquage de l'AQP3-GFP (vert) et de ZO-1 (rouge).

Dans les cellules MDCK cultivées dans un milieu contenant 0,15mM de Ca^{2+} , l'AQP3 a une localisation intracellulaire bien distincte de celle de ZO-1. A 1,5mM de Ca^{2+} , l'AQP3

présente une localisation qui évoque les membranes plasmiques. Effectivement, dans ces conditions, l'AQP3 colocalise largement avec ZO-1.

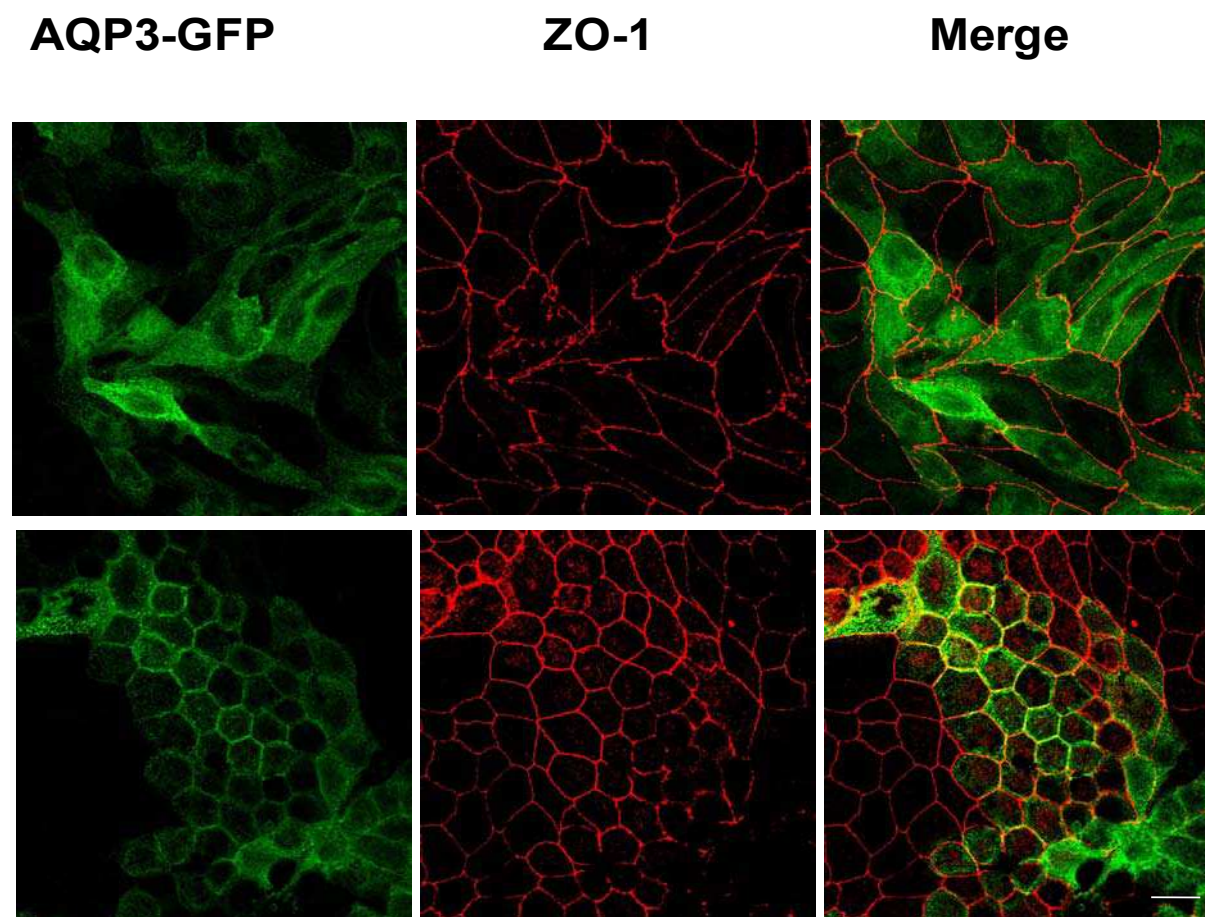


Figure RIII. 9. Localisation subcellulaire de l'AQP3-GFP dans les cellules MDCK:
Double marquage avec ZO-1. Cellules traitées pendant 48h avec 0,15mM Ca^{2+} (haut). Cellules traitées pendant 48h avec 1,5mM Ca^{2+} (bas). ZO-1 marquage en rouge. Barre : 10 μm

En prenant en compte tous les résultats obtenus de ces diverses expériences, nous pouvons conclure que, dans les cellules épithéliales MDCK, l'AQP3-GFP est localisée au niveau du réticulum endoplasmique dans des cellules cultivées en faible concentration de calcium (0,15mM 24h). A forte concentration de calcium, l'AQP3-GFP est adressée à la membrane plasmique (1,5mM 48h). Dans le même temps, on observe un changement sensible

de morphologie cellulaire qui s'accompagne d'une redistribution partielle d'autres marqueurs cellulaires, comme le RIP3 et le PDI.

La figure RIII. 10 montre un double marquage de l'AQP2-Cherry (rouge) et ZO-1 (vert). Contrairement à l'AQP3-GFP, que les cellules soient cultivées à 0,15mM ou à 1,5mM de Ca^{2+} , l'AQP2 présente toujours une localisation intracellulaire et ne colocalise jamais avec ZO-1.

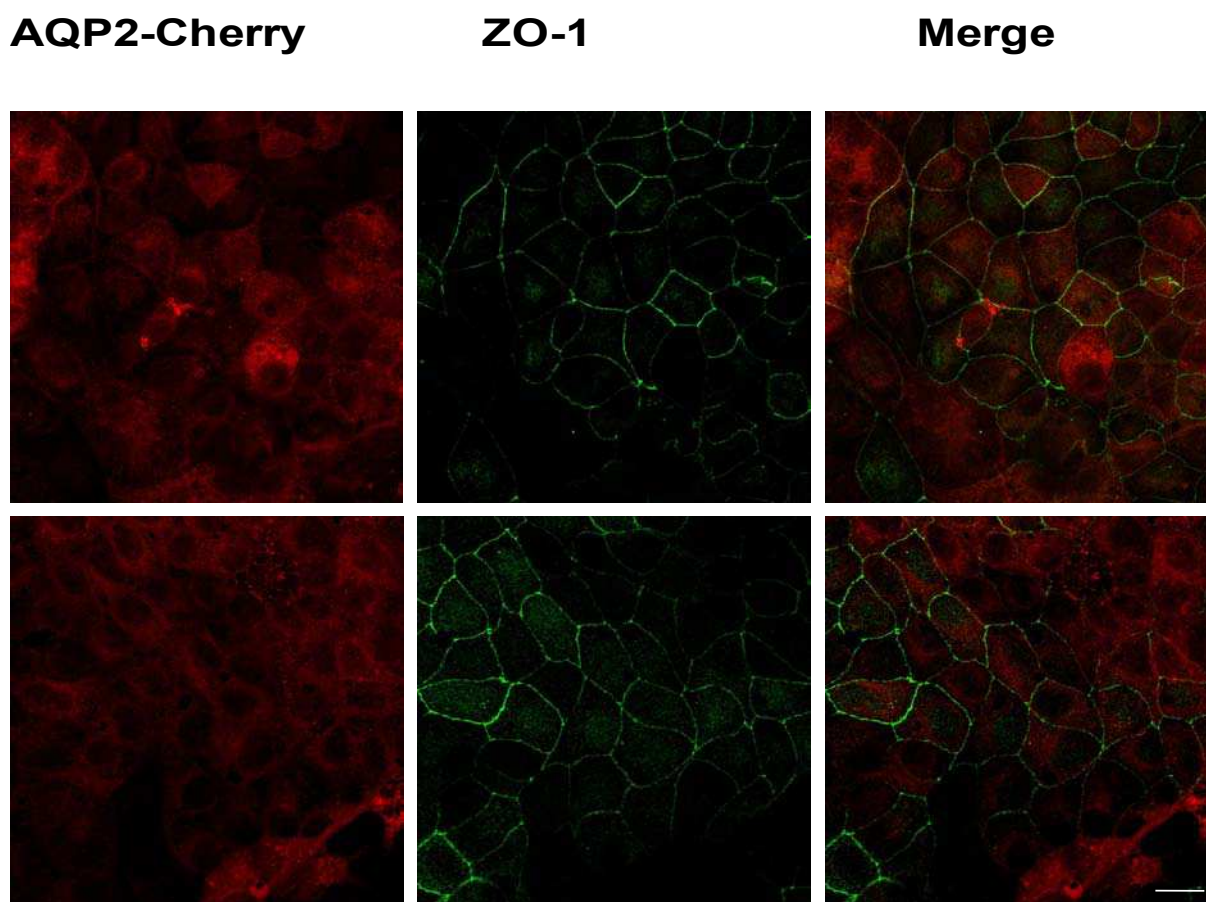


Figure RIII. 10. Localisation subcellulaire de l'AQP2-Cherry dans les cellules MDCK: Double marquage avec ZO-1. Cellules traitées pendant 48h avec 0,15mM Ca^{2+} (haut). Cellules traitées pendant 48h avec 1,5mM Ca^{2+} (bas). ZO-1 marquage en vert. Barre : 10 μm

Ainsi, dans les cellules MDCK, le calcium induit un adressage de l'AQP3-GFP du réticulum endoplasmique vers les membranes plasmiques. Ce changement de localisation est spécifique à l'AQP3; il n'est pas observé pour l'AQP2, qui est localisée dans un

compartiment intracellulaire distinct de l'AQP3 et ne change pas de localisation en réponse au calcium.

III. 3 Cinétique d'adressage de l'aquaporine 3 dans les cellules MDCK.

Afin d'étudier la cinétique d'adressage de l'AQP3 à la membrane plasmique, nous avons réalisé une expérience de « calcium switch ». Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence avec le milieu DMEM (2,8mM Ca^{2+}). L'AQP3 est localisée à la membrane plasmique. Douze jours après confluence, les cellules sont rincées au PBS. Dans ces conditions, l'AQP3 est localisée à la membrane plasmique. Ensuite, le milieu DMEM est remplacé par le milieu EMEM sans calcium.

Une première cinétique réalisée chaque 30mn et ensuite chaque 15mn, nous a permis de conclure que l'AQP3 est complètement internalisée après 45mn sans calcium (figure RIII. 11, $t=0$).

A $t=0$, nous avons rajouté au milieu EMEM, 1,5mM Ca^{2+} et nous avons fait une deuxième cinétique avec des intervalles de 1h (toute la cinétique n'est pas montrée, seuls les résultats pertinents le sont). Comme illustré figure RIII. 11, l'AQP3 intracellulaire à $t=0$ est partiellement redistribuée à la membrane plasmique 2h après ajout de Ca^{2+} . Elle y est complètement ré-adressée au bout de 6h.

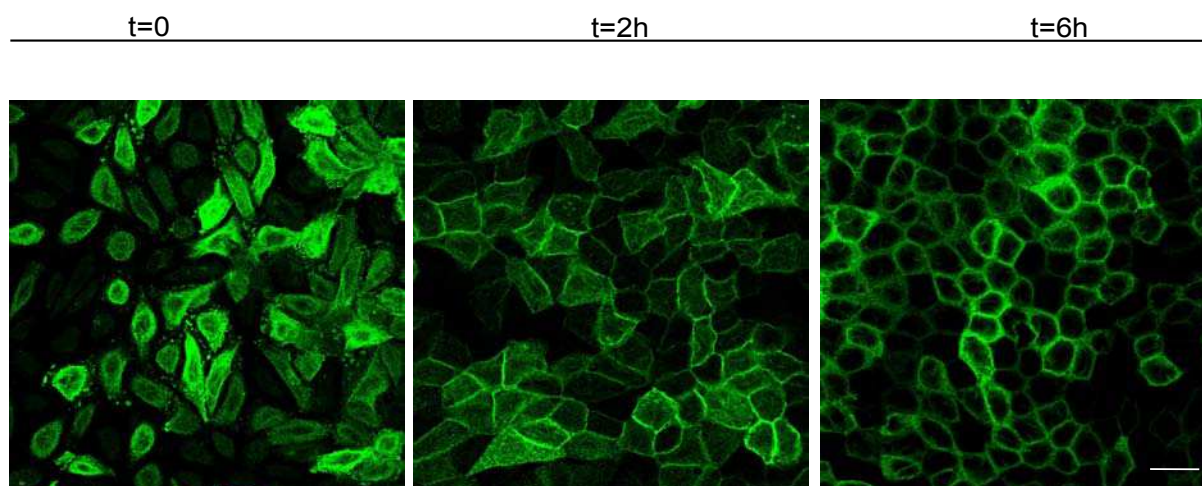


Figure RIII. 11. Cinétique d'adressage de l'AQP3 dans les cellules MDCK. t= 0: cellules en milieu sans Ca^{2+} ; t= 2h et t= 6h : cellules avec 1,5mM Ca^{2+} . Barre : 10 μm

Dans les premières expériences, il nous avait fallu 48h pour que l'AQP3 soit complètement adressée à la membrane plasmique. Il s'agissait de cellules pré-confluentes (ensemencées à 10⁵ cellules/puits de 16,2mm de diamètre). Ici, nous avons attendu 12 jours après confluence, vérifié l'adressage de l'AQP3 aux membranes plasmiques et induit sa réinternalisation de manière transitoire à l'aide d'un milieu sans calcium.

Le trafic rapide de l'AQP3 entre les membranes plasmiques et le compartiment intracellulaire que nous observons ici dans des cellules différenciées (figure RIII. 11) nous a conduit à étudier le lien entre l'adressage de l'AQP3 et la polarité cellulaire. La protéine ZO-1 est l'un des précurseurs de l'établissement des jonctions serrées et de la polarité (Zahraoui, Louvard et al. 2000). De plus, le calcium est un élément important de l'établissement des jonctions et de la polarité cellulaire. C'est pourquoi, nous avons voulu comparer l'effet du « calcium switch » sur la localisation de la protéine ZO-1 et celle de l'AQP3. Nous avons donc étudié dans les mêmes conditions que pour l'AQP3, la cinétique d'adressage de ZO-1 (figure RIII. 12).

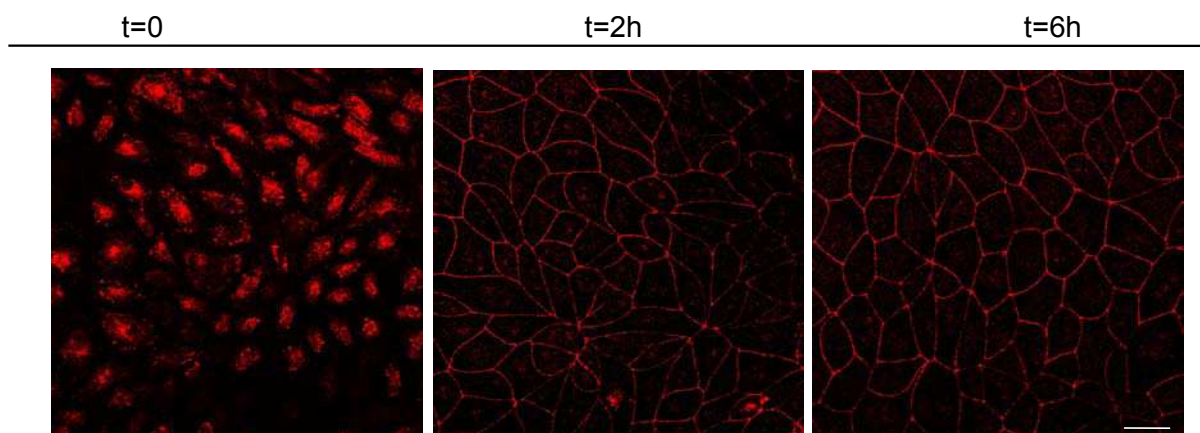


Figure RIII. 12. Cinétique d'adressage de ZO-1 dans les cellules MDCK. $t=0$: cellules en milieu sans Ca^{2+} ; $t=2\text{h}$ et $t=6\text{h}$ cellules avec $1,5\text{mM Ca}^{2+}$. Barre : $10\mu\text{m}$

Comme l'AQP3, la protéine ZO-1 est internalisée rapidement (45mn) après retrait du calcium. Cependant, ZO-1 est redistribuée à la membrane plasmique dès 2h après ajout de $1,5\text{mM Ca}^{2+}$, plus rapidement qu'AQP3 dont l'adressage n'est complet qu'après 6h (figure RIII. 11).

Ainsi, l'adressage de l'AQP3 aux membranes plasmiques semble être lié à l'établissement de la polarité cellulaire. En absence de calcium pendant 45mn, les jonctions cellulaires sont déstabilisées, l'AQP3 et ZO-1 sont internalisées. Après ajout de $1,5\text{mM Ca}^{2+}$, ZO-1 est rapidement redistribuée à la membrane plasmique (24h). L'adressage de l'AQP3 est plus tardif (6h) mais demeure beaucoup plus rapide qu'en réponse à la confluence et à la différenciation cellulaire (48h).

Le calcium est un élément déterminant aussi bien dans la polarité cellulaire que dans la différenciation cellulaire. Dans un milieu sans calcium, les cellules MDCK perdent leur polarité. Il ressort de l'analyse des figures RIII. 11 et RIII 12, que l'AQP3 n'est localisée à la membrane plasmique qu'après établissement des complexes jonctionnels (ZO-1). Ceci nous amène à proposer que, la relocalisation de l'AQP3 à la membrane plasmique des cellules MDCK requiert probablement l'établissement d'une polarité cellulaire de ces cellules épithéliales.

Dans l'ensemble, l'AQP3 est plutôt une protéine de cellules épithéliales (épithélium rénal, colonique, hépatique...). Nos résultats suggèrent que la localisation subcellulaire de l'AQP3 est liée à l'état de polarité de ces cellules. Cela semble être le cas dans les

kératinocytes (figure RI. 1) mais comme nous venons de le montrer, c'est également le cas dans les cellules MDCK, d'origine rénale.

IV. Voies de signalisations impliquées dans l'adressage de l'AQP3

Nous venons de montrer que dans les cellules MDCK, le calcium régule sélectivement l'adressage de l'AQP3 mais pas celui de l'AQP2. A faible concentration de calcium, l'AQP3 est localisée dans le réticulum endoplasmique et à forte concentration elle est transloquée à la membrane plasmique. Dans cette partie, nous nous intéressons à la signalisation cellulaire de l'AQP3 dans les cellules MDCK. Le trafic de l'AQP2, médié par l'AMPc et la PKA a été largement étudié dans les cellules rénales (Takata, Matsuzaki et al. 2004; Kamsteeg, Duffield et al. 2007; Takata, Matsuzaki et al. 2008). Cette voie de signalisation n'a aucun effet régulateur sur l'adressage de l'AQP3. Cependant, le trafic de l'AQP3 dans les cellules rénales et en général dans les cellules épithéliales a été peu étudié (Yasui, Kubota et al. 2008).

Le modèle de signalisation calcique kératinocytaire proposé par Bikle et al, 2004 (figure C.II.4.3.2), propose plusieurs voies par lesquelles le calcium induit la différenciation des kératinocytes. L'une de ces voies fait intervenir la phospholipase-C (PLC). Dans ses travaux sur les cellules intestinales Caco-2, Hideyuki Yasui a montré à l'aide d'inhibiteur spécifique, que la protéine kinase C (PKC) régule l'expression de l'AQP3 (Yasui, Kubota et al. 2008). La PKC est une protéine dépendante du calcium. La PLC et la PKC interviennent dans la voie de signalisations des récepteurs couplés aux protéines G (Dorn and Force 2005). Aussi, pour déterminer la voie de signalisation impliquée dans l'adressage de l'AQP3 des les cellules MDCK, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques de la voie PLC-PKC. Nous avons utilisé dans un premier temps un inhibiteur de la phospholipase C: U73343 (Ward, Klein et al. 2002; Yasui, Kubota et al. 2008). U73343 est en fait un inhibiteur de la PLC β .

Pour ces expériences, les cellules sont initialement placées dans un milieu EMEM contenant 1,5mM de Ca²⁺. L'AQP3 est alors localisée à la membrane plasmique (voir figure RIII. 2). Les cellules sont ensuite traitées par 2 μ M de U73343 pendant un temps variable de 1h à 5h.

3h après traitement au U73343, un inhibiteur de la PLC β (Ward, Klein et al. 2002; Yasui, Kubota et al. 2008), l'AQP3 présente une localisation intracellulaire et colocalise avec PDI. Elle est donc localisée au niveau du RE. Par contre, dans les mêmes conditions, U73343, n'a aucun effet sur l'adressage de ZO-1 (figure RIV. 1).

Ainsi, U73343 induit une réinternalisation spécifique de l'AQP3 à la membrane plasmique, vers le réticulum endoplasmique. Donc la localisation de l'AQP3 à la membrane plasmique est dépendante de la phospholipase C β .

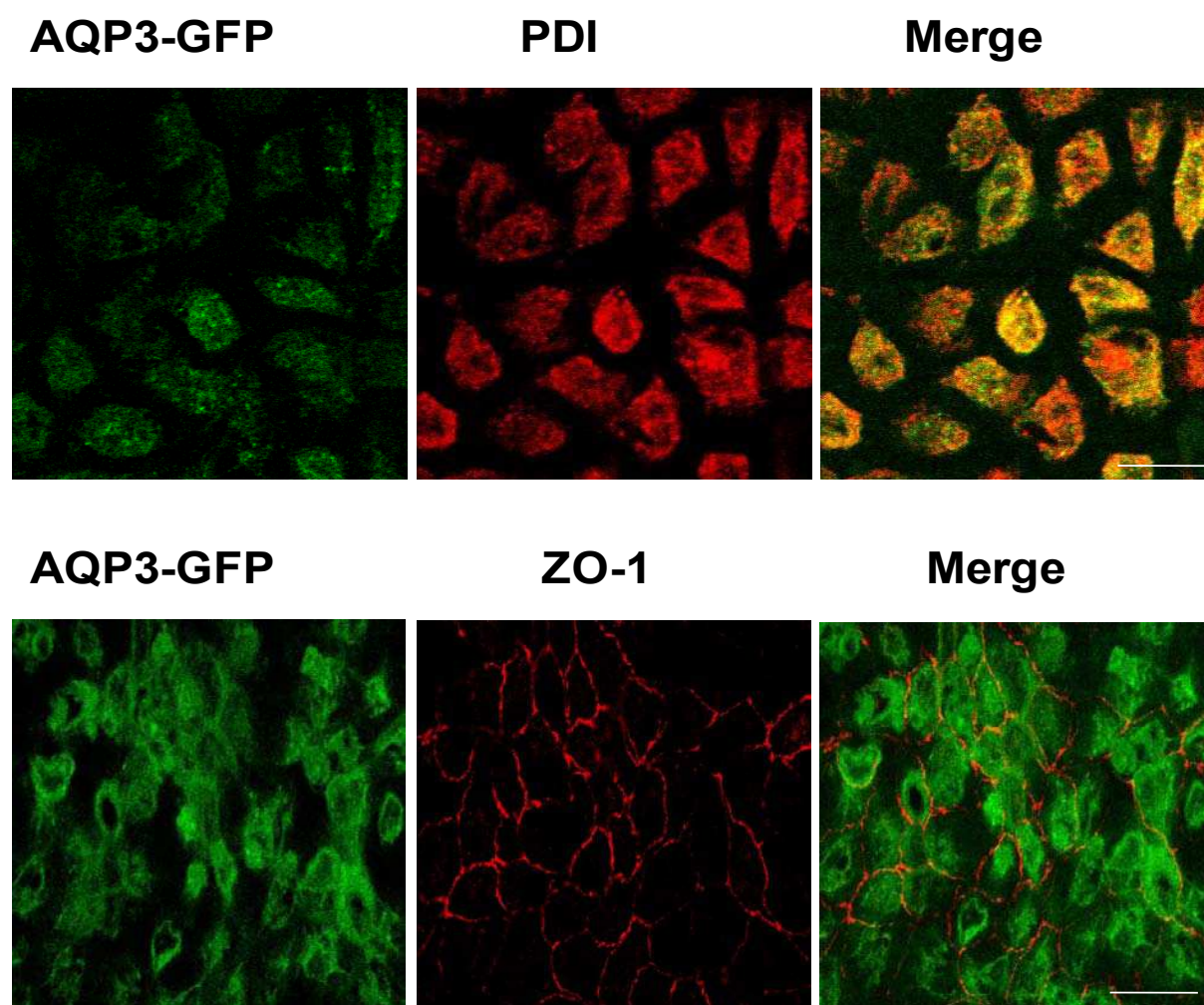


Figure RIV. 1. L'expression de l'AQP3 à la membrane plasmique est dépendante de la phospholipase C.

Cellules traitées avec 2 μ M de U73343 pendant 3h. (Haut) internalisation de l'AQP3 dans le compartiment positif pour PDI (RE). (Bas) pas de colocalisation entre AQP3 et ZO-1. Barre : 20 μ m

Pour étudier le rôle de la protéine kinase C (PKC), nous avons utilisé une autre drogue ; Ro-32-0432, un inhibiteur des PKC conventionnelles (Hui and Nayak 2002).

De même que précédemment, les cellules sont initialement placées dans un milieu EMEM contenant 1,5mM Ca^{2+} et l'AQP3 est localisée à la membrane plasmique. Les cellules sont ensuite traitées par un inhibiteur de PKC, Ro-32-0432 (Hui and Nayak 2002) à 10 μM pendant 3h.

Après traitement au Ro-32-0432, l'AQP3 présente de nouveau une localisation intracellulaire et colocalise avec PDI. L'AQP3 est donc localisée au niveau du RE. De même que l'inhibiteur de PLC, l'inhibiteur de PKC n'a aucun effet sur la protéine ZO-1 dans ces conditions (figure RIV. 2).

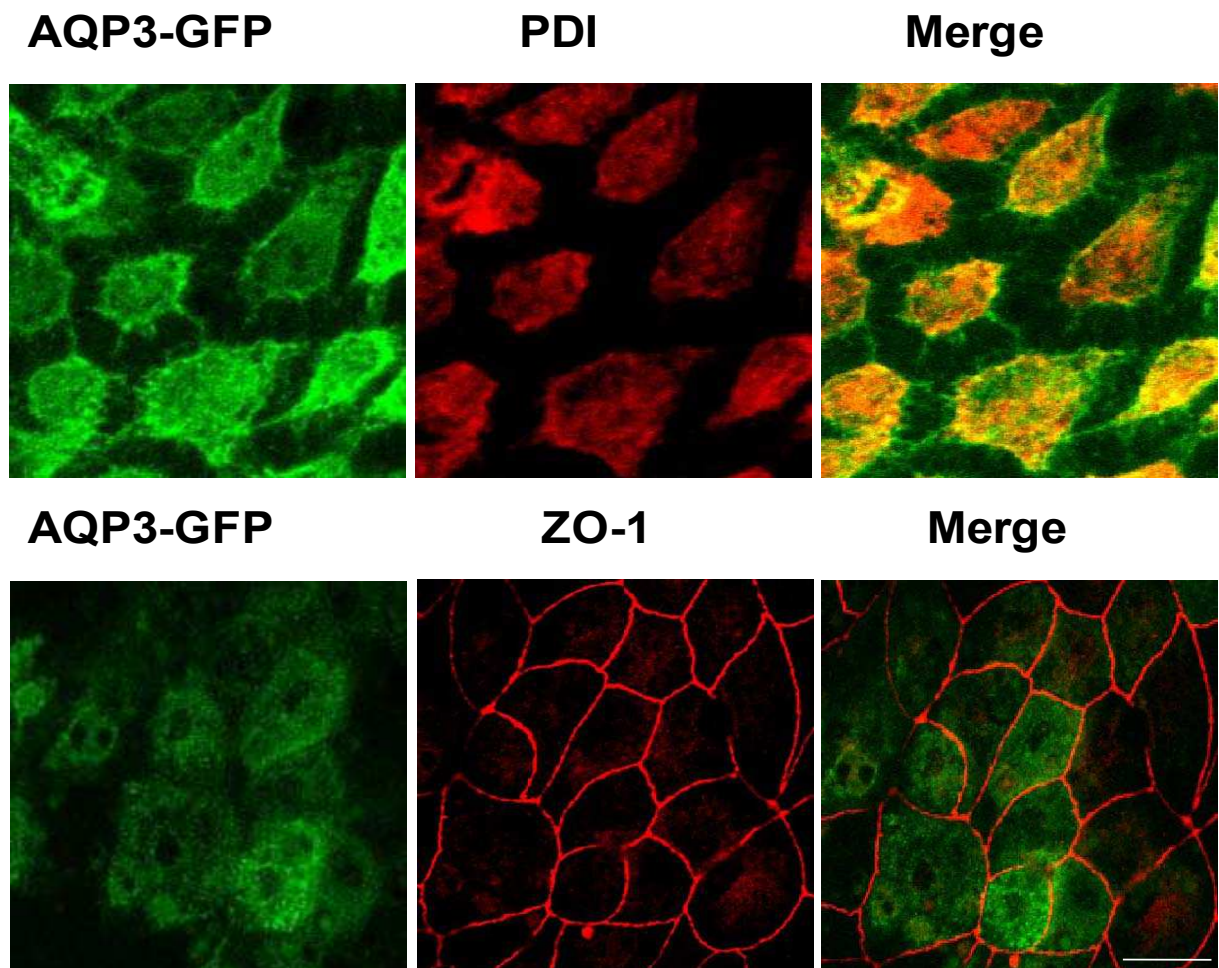


Figure RIV. 2. La PKC intervient dans l'adressage de l'AQP3 dans les cellules MDCK. Cellules traitées avec 10 μM de Ro-32-0432 pendant 3h. (Haut) internalisation de l'AQP3 dans le compartiment positif pour PDI (RE). (Bas) pas de colocalisation entre AQP3 et ZO-1. Barre: 20 μm

Weiler et al, ont montré au cours de leurs travaux une diminution du niveau d'expression de ZO-1 lorsque les cellules sont traitées par l'inhibiteur Ro 31-8425 de la PKC (Weiler, Marbe et al. 2005). Ainsi, la PKC pourrait moduler l'expression de ZO-1, mais pas sa localisation cellulaire.

Nos résultats suggèrent que la régulation de l'adressage de l'AQP3 par le calcium se fait via la voie PKC. Il existe plusieurs isoformes de la PKC (PKC β , PKC γ , PKC δ , PKC α , PKC θ ...). Il serait intéressant de préciser quel type de PKC est impliqué dans l'adressage de l'AQP3 à l'aide d'inhibiteurs spécifiques de PKC tels que LY333531 pour la PKC β (Komander, Kular et al. 2004) et Rotterlin pour la PKC δ (Tsai, Lin et al. 2011). Par manque de temps, nous n'avons pas pu réaliser ces expériences.

Nous venons de montrer que l'inhibiteur de PKC conduisait à une localisation intracellulaire de l'AQP3. A l'inverse, nous avons utilisé un activateur de PKC, le PMA (phorbol-12, myristate-13, acétate), pour voir si on aurait une augmentation de la translocation de l'AQP3 à la membrane plasmique.

Cette fois, les cellules sont initialement placées dans un milieu EMEM contenant 0,15mM Ca^{2+} . Dans ces conditions, l'AQP3 présente maintenant une localisation intracellulaire (figure RIII. 2, gauche). Les cellules sont ensuite traitées avec 100nM de PMA pendant 3h

Après traitement au PMA, l'AQP3 a une localisation intracellulaire et colocalise avec PDI (figure RIV. 3). Cependant, il semble qu'une fraction de la membrane plasmique soit enrichie en AQP3. Le PMA n'affecte pas la localisation de ZO-1. Par contre, en présence du PMA, les cellules ont changé de forme. En effet, nous avons observé que les cellules présentent une forme allongée et certaines se sont recourbées en adoptant une forme en arc de cercle. L'effet du PMA sur les cellules MDCK semble donc être beaucoup plus large que les inhibiteurs des voies PLC et PKC et il est donc difficile de conclure.

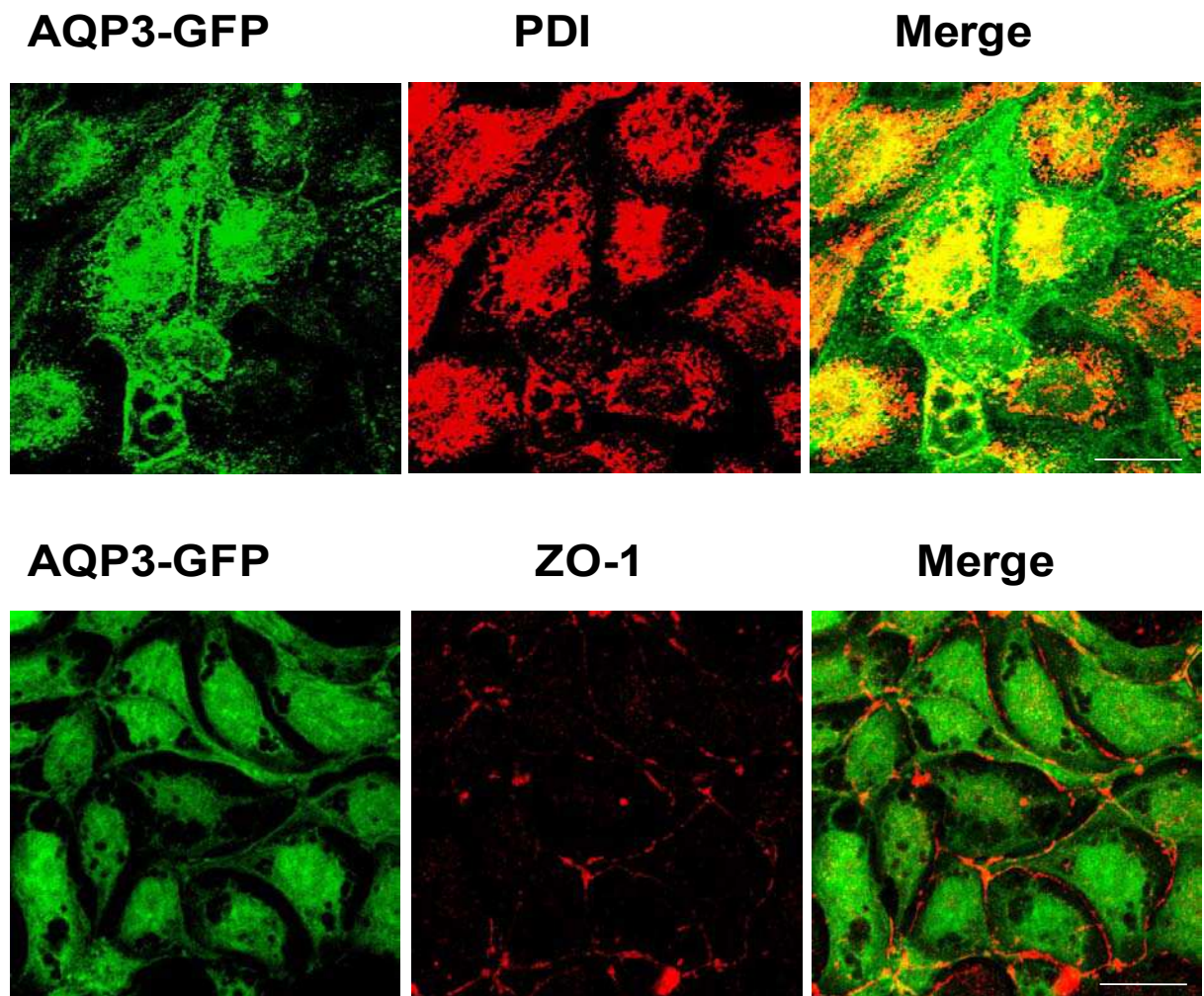


Figure RIV. 3. Le PMA n'induit pas la translocation de l'AQP3 dans les cellules MDCK. Cellules traitées avec 100nM de PMA pendant 3h. (Haut) l'AQP3 est localisée au niveau du réticulum endoplasmique. (Bas) pas de colocalisation entre AQP3 et ZO-1. Barre : 20µm

En traitant les cellules avec 1µM de PMA, nous avons observé une mortalité importante des cellules avec bien sur leur détachement. Ce qui semble indiquer une toxicité du PMA à cette concentration.

V. Rôles du cytosquelette

Le cytosquelette est impliqué dans plusieurs événements cellulaires y compris le trafic membranaire comme l'endocytose et l'exocytose. En effet, le transport de vésicules est dépendant de protéines qui se déplacent le long des microtubules ou des microfilaments. Les protéines impliquées dans le transport vésiculaire le long des microtubules et des microfilaments sont: la kinésine, la dynéine et la myosine (Hirokawa, Noda et al. 1998; Berg, Powell et al. 2001). La kinésine et la dynéine transportent les vésicules le long des microtubules alors que la myosine les transportent le long des microfilaments. De nombreuses études ont montré l'importance du cytosquelette dans le trafic de protéines. Les filaments d'actine jouent un rôle clé dans le trafic de l'AQP2 (Tajika, Matsuzaki et al. 2005). La dépolymérisation des filaments d'actine par la cytochalasine D ou la latrunculine B inhibe la translocation de l'AQP2 des endosomes précoces vers le compartiment subapical. C'est pourquoi nous avons également souhaité étudier l'implication éventuelle du cytosquelette d'actine dans le trafic intracellulaire de l'AQP3.

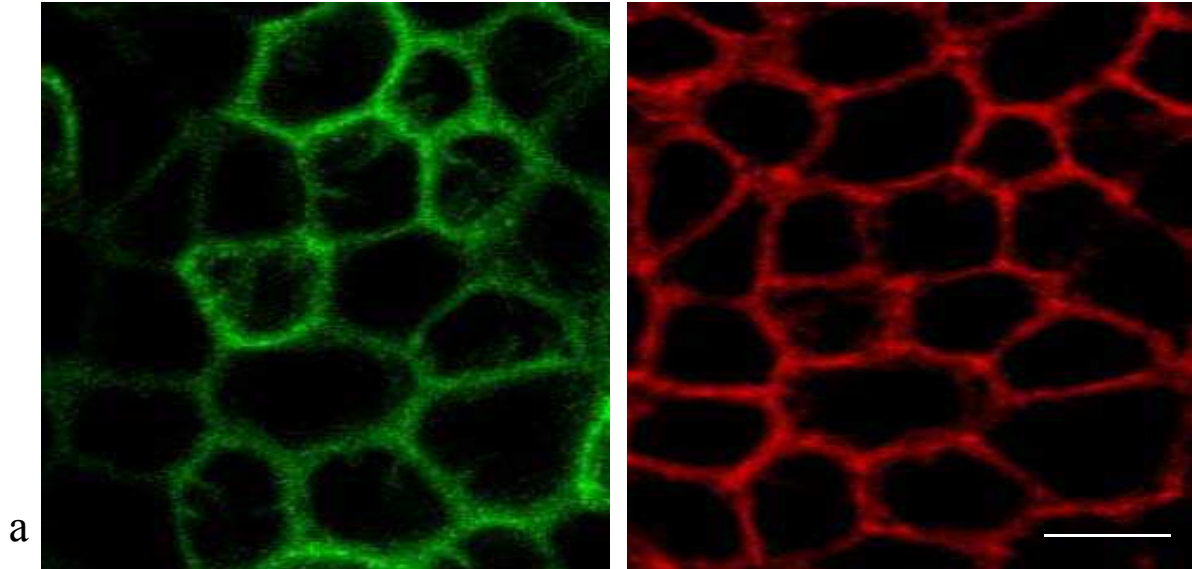
Afin d'identifier le cytosquelette d'actine, nous avons utilisé la phalloïdine, toxine extraite de l'Amanite phalloïde qui a pour propriété de se fixer à toute l'actine, permettant ainsi de visualiser le réseau actinien. Dans le but de dépolymériser le cytosquelette d'actine, nous avons utilisé la cytochalasine D (Cooper 1987).

Dans cette expérience, les cellules sont traitées avec du milieu EMEM contenant 1,5mM de Ca^{2+} . L'AQP3 est localisée à la membrane plasmique (figure RV a, gauche). De même, le cytosquelette d'actine est particulièrement abondant à la périphérie des cellules (figure RV a, gauche). Les cellules sont ensuite traitées avec 20 μM de cytochalasine D dans le même milieu EMEM contenant 1,5mM de Ca^{2+} pendant 3h (figure RV b). J'ai utilisé cette concentration et ce temps de traitement car, aucun effet n'est observé à des temps plus courts ou à concentration plus faible. Malgré la présence de 1,5mM de Ca^{2+} dans le milieu EMEM, on observe une endocytose de l'AQP3 (figure RV b, gauche), parallèlement à la désorganisation du cytosquelette d'actine (figure RV b, droite). Ceci montre que la localisation de l'AQP3 à la membrane plasmique est dépendante du cytosquelette d'actine.

AQP3

Phalloïdine

EMEM 1,5mM Ca²⁺



EMEM 1,5mM Ca²⁺ + Cytochalasine D

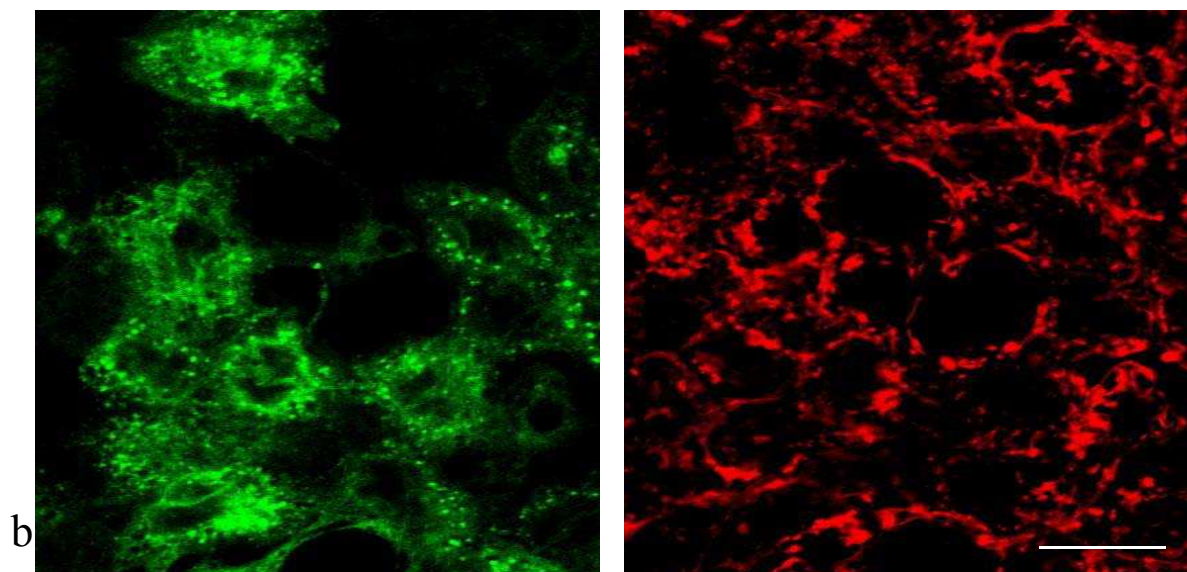


Figure RV. Rôle du cytosquelette dans l'adressage de l'AQP3.

Cellules traitées avec 1,5mM Ca²⁺ (a). Localisation de l'AQP3 à la membrane plasmique (gauche) et localisation péricellulaire du cytosquelette d'actine (droite). Cellules traitées avec 1,5mM

de Ca^{2+} + 20 μM de cytochalasine D pendant 3h (b). Internalisation de l'AQP3 (gauche) et dépolymérisation du cytosquelette d'actine (droite). Barre : 20 μm

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Tajika et al, 2005. Dans leurs travaux sur l'AQP2 dans les cellules MDCK, ces auteurs ont montré que le transfert de l'AQP2 des endosomes précoces à la membrane plasmique apicale requiert le cytosquelette d'actine.

Pour l'AQP3, nous n'avons pas pu déterminer si l'effet de la cytochalasine D sur la localisation de l'AQP3 résulte d'une augmentation de l'endocytose ou d'un défaut d'adressage à la membrane plasmique. Dans ce but, nous aurions pu faire des expériences avec des inhibiteurs des voies de l'endocytose comme la cyclodextrine.

Discussion

I. Obtention de clones stables exprimant les aquaporines fluorescentes 2 et 3

Extraite du corail *Discosoma*, la protéine DsRed possède un maximum d'excitation à une longueur d'onde bien distincte de celle des autres protéines fluorescentes GFP (Green Fluorescent Protein) ou YFP (Yellow Fluorescent Protein). Ceci permet l'observation de deux protéines à la fois, l'une étiquetée par exemple GFP et l'autre DsRed, puisque les deux spectres d'excitation se recouvrent peu. Néanmoins, il a été montré que la protéine DsRed dans sa forme d'origine présente une maturation lente et parfois incomplète ainsi qu'une tendance à la tétramérisation (Campbell, Tour et al. 2002). Il a été également rapporté que les protéines chimères comportant la DsRed forment des agrégats intracellulaires (Lauf, Lopez et al. 2001). Plusieurs variants monomériques de la DsRed ont donc été créés par mutation du gène d'origine. C'est ainsi que la protéine mCherry a été obtenue. Elle possède une maturation complète, rapide et une brillance plus grande.

Lors de ce travail, nous n'avons pas pu obtenir de clones stables de cellules HaCat (lignée de kératinocytes humains) exprimant AQP2-Cherry et AQP3-GFP, alors que des clones stables de cellules MDCK exprimant ces mêmes protéines ont été obtenus. Voici quelques éléments de réponses pouvant expliquer cette différence.

L'efficacité de transfection: Dans la littérature, il n'y a pas de procédé standard pour réaliser la transfection de cellules HaCats et obtenir des clones stables. Plusieurs méthodes ont été déjà utilisées telles que la lipofection par divers agents (Bigelow, Jen et al. 2005; Yasukawa, Sawamura et al. 2007), le vecteur adénoviral (Hirsch, von Peter et al. 2006) ou la nucléofection (Allen, Winters et al. 2008). Au cours de nos travaux, nous avons toujours obtenu une faible efficacité de transfection. Ce qui est en accord avec les observations de (Jacobsen, Mertens-Rill et al. 2006) Il a montré que l'efficacité de transfection est très faible pour cette lignée cellulaire et qu'on obtient de meilleurs résultats avec la nucléofection. Pour nos travaux, nous avons utilisé la méthode de lipofection par divers agents en l'occurrence la lipofectamine et le fugène. La société Amaxa propose un protocole optimisé de nucléofection (Cell Line Nucleofactor KitV) principalement dédié aux cellules HaCats, ce qui montre qu'il existe une vraie demande pour pouvoir améliorer les transfections de cette lignée cellulaire. Contrairement aux cellules HaCats, la lignée cellulaire MDCK a une très bonne efficacité de transfection, ce qui facilite bien évidemment la sélection de clones stables car la probabilité

qu'une cellule ait intégré le plasmide dans son génome dépend de la probabilité que le vecteur ait pu pénétrer dans la cellule. J'aurais pu utiliser la méthode nucléofection, mais cela ne me garantissait pas non plus l'obtention de clones stables HaCats car d'autres facteurs entrent en ligne de compte.

La difficulté à sélectionner des cellules ayant intégré le vecteur: dans ce cas aussi, les données concernant la concentration de l'antibiotique de sélection (G418) à utiliser pour sélectionner les cellules HaCats varient énormément dans la littérature. Comme en témoigne ces exemples: 300µg/mL selon (Yasukawa, Sawamura et al. 2007), 1mg/mL pour (Kahata, Hayashi et al. 2004). En effet, la concentration de G418 à utiliser dépend du fournisseur, de l'état des cellules utilisées (nombre de passages, densité) ainsi que de la fréquence de modification du milieu de culture. Pour palier ce problème, il est donc nécessaire de déterminer à chaque nouvelle expérience la concentration optimale de G418 en réalisant une courbe de sensibilité. Cette courbe nous a permis de dégager une concentration de 1mg/mL pour les cellules HaCats et 750µg/mL pour les cellules MDCK. Les cellules MDCK sont à peine plus sensibles que les cellules HaCats. La cinétique d'action de la G418 diffère aussi entre les cellules MDCK et HaCats. En effet, les cellules MDCK meurent plus pendant les premiers jours de sélection et se divisent peu. Après quelques semaines de sélection, des colonies de cellules ne comportant que des cellules fluorescentes sont visibles. En revanche, les cellules HaCats forment un tapis et ne sont pas faciles à décoller. Au bout de quelques semaines, on obtient des colonies contenant à la fois des cellules fluorescentes et des cellules non fluorescentes. Le gène de résistance à la G418 code une enzyme dégradant l'antibiotique, donc la présence de cellules résistantes dans une boîte diminue la concentration en G418 du milieu. La concentration en antibiotique peut ainsi devenir inférieure à celle qui est nécessaire pour tuer les cellules non transfectées. Une solution serait de changer le milieu de culture plus fréquemment, afin de maintenir constant la concentration de G418.

On peut améliorer la sélection des clones grâce à un trieur de cellules (Meng, Liang et al. 2000). Les trieurs de cellules sont des cytomètres qui permettent l'analyse et le tri de cellules sans les endommager, rendant ainsi possible la mise en culture des populations sélectionnées. En utilisant ce procédé on pourrait donc isoler les cellules présentant une fluorescence supérieure à un seuil fixé et ainsi éliminer de la culture toutes cellules non fluorescentes.

La disparition de la fluorescence des cellules sélectionnées: au bout de quelques semaines, les îlots de cellules HaCats fluorescentes ayant intégré le vecteur dans leur génome deviennent non fluorescentes malgré la poursuite du traitement à la G418. Comment expliquer cette disparition de fluorescence après quelques passages ? Si le vecteur avait été excisé du génome des cellules transfectées au cours de la reprise du cycle cellulaire, la G418 aurait tué toutes les cellules en quatorze jours, comme lors de la réalisation de la courbe de sensibilité. Tel n'est pas le cas. Par contre, du fait de sa cinétique lente, la G418 aurait pu sélectionner des cellules non porteuses du vecteur. Ces cellules peuvent ainsi donc se développer plus facilement et prendre le dessus sur les autres. Enfin, on peut également penser que les cellules transfectées sont toujours présentes mais que l'expression du gène codant pour la protéine est éteinte. En effet, les phénomènes de « silencing » (extinction de l'expression) des transgènes dans les cellules de mammifères sont courants et bien connu (Williams, Mustoe et al. 2005). Pour tester cette hypothèse, on pourrait ajouter au milieu du butyrate de sodium, un inhibiteur d'histone désacétylase, permettant de réactiver l'expression de gènes éteints par la cellule. Le butyrate de sodium agit en déverrouillant la chromatine par modification du niveau d'acétylation des protéines histones (Chen, Bailey et al. 1997). Si on retrouve de la fluorescence au sein de notre population cellulaire, c'est la preuve que nos cellules possèdent bel et bien le gène inséré mais que des mécanismes épigénétiques limitent son expression.

Il existe néanmoins dans la littérature des articles faisant état de cellules HaCat transfectées de manière stable (Kahata, Hayashi et al. 2004; Bigelow, Jen et al. 2005; Yasukawa, Sawamura et al. 2007). La génération de clones stables à partir de cette lignée cellulaire est donc possible, même si la transfection et la stabilisation de ces cellules sont plus difficiles que celles d'autres cellules plus classiquement utilisées en transfection.

II. Calcium et adressage des aquaporines

II. 1. Adressage de l'AQP3

En 1995, Frigeri et al, ont été les premiers à identifier l'expression de l'aquaporine 3 au niveau de l'épiderme de rat. Sa présence a ensuite été détectée dans l'épiderme de souris

(Ma, Hara et al. 2002) et au niveau des kératinocytes de l'épiderme humain (Sougrat, Morand et al. 2002).

Les kératinocytes, cellules majoritaires de l'épiderme, apparaissent au cours du développement embryonnaire et ont pour origine l'ectoderme superficiel. Les kératinocytes sont organisés en divers strates au niveau de l'épiderme. C'est par un processus constant de prolifération, de différenciation et enfin de sénescence que les kératinocytes assurent le renouvellement permanent de l'épiderme (Fuchs 2008). Ce processus est sous le contrôle de plusieurs facteurs parmi lesquels le calcium est un facteur clé. En effet, le calcium joue un rôle majeur dans la différenciation cellulaire (Hennings, Michael et al. 1980; Boyce and Ham 1983) et sa concentration est plus élevée lors qu'on remonte vers les couches supérieures de l'épiderme (Menon, Grayson et al. 1985).

Nous avons montré au cours de ce travail que la différenciation induite par le calcium modifie l'adressage de l'aquaporine 3 dans les kératinocytes. A faible concentration extracellulaire de Ca^{2+} , l'AQP3 présente une localisation intracellulaire dans les cultures primaires de kératinocytes alors qu'à forte concentration, l'AQP3 est localisée à la membrane plasmique. Nous avons également montré que des MDCKs, exprimant l'AQP3 récapitulent ce modèle de régulation. Les MDCKs sont donc un bon modèle pour l'étude de la régulation de l'adressage de l'AQP3 dans les kératinocytes. Dans ce modèle également, l'AQP3 est localisée au niveau du réticulum endoplasmique à faible concentration de Ca^{2+} extracellulaire (0,15 mM). A concentration plus élevée de Ca^{2+} extracellulaire (1,5mM), elle est localisée à la membrane plasmique.

Lorsque les kératinocytes sont cultivés dans un milieu hypocalcique (0,15mM de Ca^{2+}), ils prolifèrent et se différencient très lentement (Hara-Chikuma and Verkman 2008). Leur différenciation est accélérée par une élévation de la concentration en calcium du milieu de culture (1,5mM de Ca^{2+}). L'adressage de l'AQP3 est aussi régulé par ce « Calcium switch » qui induit la différenciation des kératinocytes. La différenciation s'accompagne d'un adressage de l'AQP3 aux membranes plasmiques. Nous avons également montré dans les cellules MDCK, que l'adressage de l'AQP3 à la membrane plasmique est lié à l'établissement de la polarité cellulaire. En particulier, les traitements qui affectent les jonctions cellulaires et l'adressage basolatéral de la protéine de jonction ZO-1 affectent également la localisation de

l'AQP3. De plus, il semble que l'adressage membranaire de l'AQP3 soit toujours postérieur à celui de ZO-1.

D'autres études ont montré que plusieurs facteurs peuvent réguler l'expression de l'AQP3. Ainsi, dans les cellules Caco-2, l'épinéphrine augmente l'expression de l'AQP3 (Yasui, Kubota et al. 2008), l'ion magnésium augmente l'expression de l'ARNm de l'AQP3 (Okahira, Kubota et al. 2008). Dans les cellules MDCK, un milieu hypertonique (raffinose ou chlorure de sodium) augmente l'expression de l'AQP3 (Matsuzaki, Suzuki et al. 2001; Yasui, Kubota et al. 2008). Dans les cellules A549 (cellules épithéliales pulmonaires d'origine humaine), le dexaméthasone augmente l'expression de l'AQP3 (Tanaka, Inase et al. 1997). Par ailleurs, il a été montré que l'insuline diminue l'expression de l'AQP3 dans les cellules Caco-2 (Higuchi, Kubota et al. 2007). Cependant, peu des études citées ci-dessus, se sont intéressées à la localisation subcellulaire de l'AQP3. Pourtant, la localisation subcellulaire d'une protéine est un aspect important de sa fonction. Il est même fréquent que la localisation subcellulaire d'une protéine soit un élément important de sa régulation. C'est notamment le cas de l'AQP2, dont le rôle dans la réabsorption d'eau transépithéliale dépend de sa localisation à la membrane plasmique (Katsura, Verbavatz et al. 1995; Gustafson, Levine et al. 1998; Brown 2003; Tajika, Matsuzaki et al. 2004; Tajika, Matsuzaki et al. 2005; Nedvetsky, Stefan et al. 2007; Takata, Matsuzaki et al. 2008). Ainsi, il serait important d'étudier dans chacun des exemples ci-dessus l'influence des traitements utilisés sur la localisation sub-cellulaire de l'AQP3. Dans les cellules Caco-2, l'AQP3 est transloquée à la membrane plasmique lorsqu'elles sont traitées pendant 1h avec 1 μ M d'épinéphrine (Yasui, Kubota et al. 2008). Cet adressage, paraît donc bien plus rapide que celui que nous avons observé à l'aide de calcium dans les cellules MDCK, qui requiert plusieurs heures. Cependant dans le travail de Yasui et al., l'adressage à la membrane plasmique après une heure demeure très partiel. De plus il n'est détecté que par une méthode biochimique de fractionnement membranaire et correspond à un enrichissement de la fraction membranaire d'AQP3, plus qu'à un adressage complet. Ainsi, ces résultats sont compatibles avec les nôtres, où nous avons attendu d'obtenir un adressage pratiquement total aux membranes plasmiques. Aussi il serait intéressant de vérifier dans le modèle Caco-2 si l'adressage d'AQP3 se poursuit et à quelle ampleur, au-delà d'une heure de traitement. Il serait également intéressant de comparer dans ce modèle la localisation d'AQP3 avec d'autres marqueurs cellulaires (dont ZO-1).

Réciproquement, Hara-Chikuma et al, (2008) ont montré que l'AQP3 n'est pas nécessaire au processus de différenciation: en induisant la différenciation des kératinocytes avec 1,5mM de Ca^{2+} , ces auteurs n'ont observé aucune différence d'expression des marqueurs de différenciation (involucrine et kératine 10) entre les souris invalidées pour le gène de l'AQP3 et les souris sauvages, qui expriment l'AQP3. Cependant l'épiderme murin est beaucoup plus fin que l'épiderme humain (Boury Jamot et al, 2006). Compte tenu des différences de structures et d'expression des aquaporines entre les épidermes murins et humains, il n'est pas nécessairement pertinent de généraliser à l'humain le rôle ou l'implication des aquaporines dans les processus de prolifération et de différenciation de l'épiderme.

Quel pourrait donc être le rôle physiologique de l'adressage régulé d'AQP3 aux membranes plasmiques des kératinocytes ? Celui-ci est vraisemblablement lié à la fonction «canal» de l'AQP3. Selon les auteurs, dans l'épiderme, cette fonction est liée soit au transport d'eau (Sougrat et al. 2002), soit au transport de glycérol (Ma et al, 2002). Chez l'homme, ces deux molécules présentent un gradient transépidermique important qui justifie la présence d'AQP3 pour en favoriser le transport. Ceci pourrait expliquer la nécessité de l'expression d'AQP3 aux membranes plasmiques dans les kératinocytes différenciés, comme cela a été suggéré dans les études précitées. Pourquoi l'AQP3 est-elle intracellulaire dans les cellules en prolifération ou dans les cellules non polarisées ? On peut noter d'une part que dans les cellules rénales, l'adressage basolatéral et non apical, de l'AQP3 est essentiel à la possibilité de régulation de la réabsorption d'eau, par régulation de l'AQP2. En ce qui concerne l'épiderme, il s'agit d'un épithélium en renouvellement permanent. On note que l'AQP3 est exprimée dans les couches profondes de l'épiderme (basales et suprabasales), mais pas dans la couche granuleuse superficielle (Boury-Jamot 2006). Ceci joue un rôle important dans l'établissement du gradient hydrique dans l'épiderme (Boury Jamot, 2011). Un aspect important de l'épiderme est sa faculté de résistance aux blessures et de régénération. Ainsi, suite à une blessure de l'épiderme, il semble important de protéger l'organisme d'éventuelles pertes en eau, jusqu'à la formation de la barrière cutanée. Dans ces conditions, l'absence d'AQP3 dans les membranes plasmiques de kératinocytes en prolifération, durant la régénération de l'épiderme, apparaît bien opportune. En somme, le switch prolifération/différenciation des kératinocytes s'accompagne de modifications importantes

dans les besoins de transports transcellulaires d'eau et/ou de glycerol qui sont bien pris en charge par la régulation d'adressage de l'AQP3 que nous avons observée.

II. 2. Adressage de l'AQP2

L'aquaporine 2 est localisée dans le rein au niveau des cellules principales du canal collecteur (Nielsen, Frokiaer et al. 2002; Morishita, Matsuzaki et al. 2005). Au cours de ce travail, nous nous sommes également intéressés, à titre de comparaison avec l'AQP3, à l'effet du calcium sur l'adressage de l'AQP2 dans les cellules MDCK. Il ressort de ces travaux que le calcium n'a aucun effet sur l'adressage de l'AQP2 dans ces cellules, à l'inverse de l'AQP3. Ces résultats sont ceux que nous attendions car des études antérieures ont montré que l'adressage de l'AQP2 est régulé par la vasopressine ou la forskoline. Nos résultats sont ainsi en accord avec ceux des études précédentes (Katsura, Verbavatz et al. 1995; Gustafson, Levine et al. 1998; Brown 2003; Tajika, Matsuzaki et al. 2004; Tajika, Matsuzaki et al. 2005; Nedvetsky, Stefan et al. 2007; Takata, Matsuzaki et al. 2008) Nous avons également montré que l'AQP2 n'est ni localisée au niveau du réticulum endoplasmique, ni au niveau du compartiment cis-Golgien. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus par Corinne et al, 1998; Tajika et al, 2002 et Tajika et al, 2006. Cependant, une fraction de l'AQP2 a été détectée dans la région β COP du Golgi (Gustafson, Levine et al. 1998). D'autres études ont également montré que l'AQP2 est localisée au niveau des endosomes (Tajika, Matsuzaki et al. 2002; Tajika, Matsuzaki et al. 2005).

Li et al, (2007) ont montré au cours de leurs travaux qu'il existe une régulation de l'expression de l'AQP2 en réponse à un signal calcique (Li, McDill et al. 2007). Cette régulation de l'expression de l'AQP2 est due à l'augmentation du calcium intracellulaire via l'ionomycine. Cette étude ne fait cependant aucun état de ce qu'il en est au niveau de la localisation de l'AQP2 dans ces diverses conditions. Il serait intéressant d'étudier dans ces conditions, la localisation cellulaire de l'AQP2. Ce qui nous permettra de voir si l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire régule l'adressage de l'AQP2.

En ce qui concerne nos travaux, la différence de localisation subcellulaire et de régulation entre l'AQP2 et l'AQP3 suggère que l'adressage à la membrane plasmique de

l'AQP3 par le calcium dans les cellules épithéliales MDCK est un phénomène spécifique de cette protéine.

III. Bases moléculaires du trafic de l'aquaporine 3 dans les cellules MDCK

Nous nous sommes intéressés aux voies de signalisations impliquées dans l'adressage de l'AQP3 dans les cellules MDCK. En présence d'inhibiteurs spécifiques U73343 et Ro-32-0432 respectivement pour la voie PLC β et la voie PKC, nous avons montré que l'AQP3 a une localisation intracellulaire, située au niveau du réticulum endoplasmique, qui devient indépendante de la concentration extracellulaire du calcium. Nous en concluons que la régulation de l'adressage de l'AQP3 induite par le calcium est dépendante de la voie PLC-PKC. Ce qui nous conduit à proposer le schéma (Figure F.III.1). Ces résultats confirment ceux obtenus par Yasui et al, 2008. Ces auteurs en utilisant les inhibiteurs U73122 et la Calphostine C respectivement pour la phospholipase C et la PKC ont montré que dans les cellules Caco-2, l'adressage de l'AQP3 induit par l'épinéphrine se fait par la voie de signalisation GqPCR- PLC- PKC. Dans l'ensemble, le mécanisme de régulation d'adressage de l'AQP3 que nous avons mis en évidence semble donc pouvoir se généraliser à d'autres modèles de cellules épithéliales où l'AQP3 est normalement exprimé. En effet, les cellules Caco-2 sont des cellules intestinales où l'AQP3 est normalement présente. De même ce mécanisme de régulation existe vraisemblablement dans les kératinocytes qui nous ont servi de modèle initial.

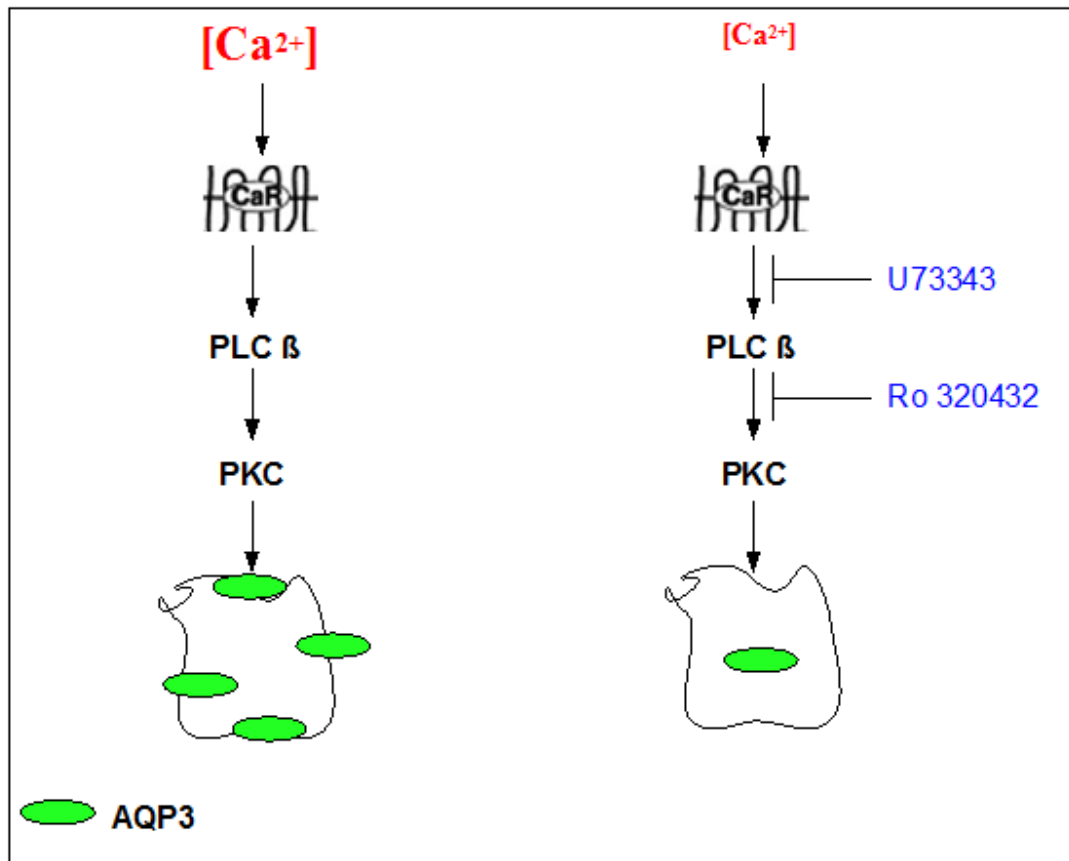


Figure F.III. 1. Schéma proposé de régulation de l'adressage de l'AQP3 dans les cellules MDCK

Zelenina et al, 2002 ont montré que dans les cellules rénales LLC-PK1, le trafic de l'AQP4 est aussi sous le contrôle de la PKC (Zelenina, Zelenin et al. 2002). Par ailleurs, d'autres études ont montré que le trafic de l'AQP4 dans les cellules gastriques HGT1 est sous le contrôle de la voie PKA (Carmosino, Procino et al. 2007), comme c'est le cas pour l'AQP2 dans les cellules rénales. La phosphorylation réversible des protéines est un moyen de régulation dynamique. L'analyse de la séquence de l'AQP4 révèle ainsi plusieurs sites potentiels de phosphorylation pour la PKA, la PKC, la CaMKII et la CK2 (Kreegipuu, Blom et al. 1999). Par exemple, la Ser¹¹¹ de l'AQP4 est phosphorylée par la PKA, les Ser¹⁸⁰ et Ser³²¹ sont phosphorylées par la PKC. De même, il est établi que la phosphorylation de Ser²⁵⁶ est essentielle à la régulation de l'adressage de l'AQP2 (Brown 2003).

Afin d'étudier plus en détail les bases moléculaires impliquées dans la régulation de l'adressage de l'AQP3, il faudrait étudier la phosphorylation éventuelle d'AQP3 lors de l'activation de son trafic. Dans un premier temps, nous avons utilisé le logiciel NetPhos2.0 pour identifier les potentiels sites de phosphorylations de l'AQP3. Nous avons ainsi déterminé trois sites potentiels de phosphorylation pour l'AQP3. Il y a la sérine en position 275, la thréonine en position 52 et la tyrosine en position 212. Il serait donc intéressant de vérifier par Western blot, si on observe effectivement une phosphorylation d'AQP3, qui se traduirait par une légère augmentation de masse apparente. Si c'est le cas, pour déterminer lesquels de ces acides aminés sont impliqués dans la régulation de l'adressage de l'AQP3, il nous faudrait réaliser des expériences de mutagenèse dirigée sur ces acides aminés et étudier si ces mutations conduisent à une modification de l'adressage de l'AQP3 dans les cellules épithéliales.

Nous avons également montré au cours de ce travail l'implication du cytosquelette d'actine dans le trafic intracellulaire de l'AQP3. Comme l'AQP2, le trafic de l'AQP3 à la membrane plasmique est dépendant du cytosquelette d'actine (Tajika, Matsuzaki et al. 2005). Les GTPases Rho jouent un rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine et contrôlent de ce fait le trafic membranaire (Qualmann and Mellor 2003). Des auteurs ont montré que la forme active de Rho inhibe la translocation de l'AQP2 des vésicules intracellulaires à la membrane plasmique (Klussmann, Tamma et al. 2001). Il serait intéressant de voir si les protéines de la famille Rho sont impliquées dans le trafic de l'AQP3 ainsi que leur influence sur le cytosquelette d'actine.

Conclusions et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons pu montrer que:

- La localisation subcellulaire de l'AQP3 dans les cultures primaires de kératinocytes est régulée au cours de la différenciation induite par le calcium.

- Dans les cellules épithéliales MDCK, la localisation subcellulaire de l'AQP3 est aussi dépendante du calcium extracellulaire. En effet, à 0,15mM de Ca^{2+} l'AQP3 est localisée au niveau du réticulum endoplasmique et à 1,5mM de Ca^{2+} l'AQP3 est localisée à la membrane plasmique. Le modèle cellulaire MDCK récapitule ainsi le comportement observé avec les cultures primaires de kératinocytes. Après ajout de 1,5mM de Ca^{2+} , la relocalisation de l'AQP3 à la membrane plasmique se fait de façon postérieure à celle de ZO-1 et cette relocalisation semble dépendante de l'établissement d'une polarité cellulaire des cellules épithéliales.

- Au contraire, le calcium ne régule pas l'adressage de l'AQP2. A 0,15 mM de calcium, comme à 1,5 mM, et même à 2,8 mM de calcium (DMEM), l'AQP2 est localisée dans un compartiment distinct du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique. Ainsi, dans les cellules MDCK, nous pouvons dire que le calcium extracellulaire régule spécifiquement l'adressage de l'AQP3, mais pas celui de l'AQP2.

- Le trafic de l'AQP3 du compartiment intracellulaire à la membrane plasmique médié par le calcium est dépendant de PLC β et de la PKC.

- Enfin, la localisation de l'AQP3 à la membrane plasmique est dépendante du cytosquelette d'actine.

A partir de ces observations, il serait intéressant:

- D'étudier plus en détail les bases moléculaires du trafic de l'AQP3. Cela fait-il intervenir une phosphorylation, comme c'est le cas pour l'AQP2 et peut-être pour l'AQP4 ? Le site éventuel de phosphorylation pourrait-être étudié par des expériences de mutagenèse dirigée.

- D'obtenir des clones stables de cellules HaCats exprimant l'AQP3-GFP et l'AQP2-Cherry en utilisant par exemple la méthode de la cytométrie en flux ou celle de la nucléofection proposée par la société Amaxa qui est dédiée aux cellules HaCats. Ceci nous

permettrait de confirmer que le modèle cellulaire HaCat et MDCK donnent les mêmes résultats et donc de renforcer l'intérêt de ce travail dans le contexte de l'épiderme.

Notre équipe a montré que deux autres aquaglycéroporines AQP9 et AQP10 sont exprimées par les kératinocytes de l'épiderme humain (Boury-Jamot 2011). AQP10 présente une localisation intracellulaire dans plusieurs couches de l'épiderme et l'AQP9 est localisée dans la couche granulaire. Il serait intéressant d'étudier l'effet du calcium sur la régulation (d'expression ou d'adressage) des AQP9 et AQP10 dans l'épiderme humain, dans les kératinocytes (cultures primaires ou lignées) et à l'aide de transfection d'autres cellules épithéliales, comme nous l'avons fait avec les MDCK, puis de les comparer ces résultats avec ceux obtenus avec l'AQP3.

Références bibliographiques

- Allen, D., E. Winters, et al. (2008). "Reference gene selection for real-time rtPCR in human epidermal keratinocytes." J Dermatol Sci **49**(3): 217-225.
- Asselineau, D., B. A. Dale, et al. (1990). "Filaggrin production by cultured human epidermal keratinocytes and its regulation by retinoic acid." Differentiation **45**(3): 221-229.
- Ackerman A. B. ; Böer A. ; Bennin B. ; Gottlieb G. J. "Histologic diagnosis of inflammatory skin diseases". Ardor Scribendi 2002-2006.
- Bamberger, C., D. Pollet, et al. (2002). "Retinoic acid inhibits downregulation of DeltaNp63alpha expression during terminal differentiation of human primary keratinocytes." J Invest Dermatol **118**(1): 133-138.
- Barile, M., T. Pisitkun, et al. (2005). "Large scale protein identification in intracellular aquaporin-2 vesicles from renal inner medullary collecting duct." Mol Cell Proteomics **4**(8): 1095-1106.
- Bedard, K., E. Szabo, et al. (2005). "Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57." Int Rev Cytol **245**: 91-121.
- Beliveau, E. and G. Guillemette (2009). "Microfilament and microtubule assembly is required for the propagation of inositol trisphosphate receptor-induced Ca²⁺ waves in bovine aortic endothelial cells." J Cell Biochem **106**(2): 344-352.
- Berg, J. S., B. C. Powell, et al. (2001). "A millennial myosin census." Mol Biol Cell **12**(4): 780-794.
- Berridge, M. J. (1997). "Elementary and global aspects of calcium signalling." J Exp Biol **200**(Pt 2): 315-319.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, et al. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 517-529.
- Berridge, M. J., P. Lipp, et al. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 11-21.
- Bigelow, R. L., E. Y. Jen, et al. (2005). "Sonic hedgehog induces epidermal growth factor dependent matrix infiltration in HaCaT keratinocytes." J Invest Dermatol **124**(2): 457-465.
- Bikle, D. D., Y. Oda, et al. (2004). "Calcium and 1,25(OH)₂D: interacting drivers of epidermal differentiation." J Steroid Biochem Mol Biol **89-90**(1-5): 355-360.
- Bikle, D. D., S. Pillai, et al. (1989). "Regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D production in human keratinocytes by interferon-gamma." Endocrinology **124**(2): 655-660.
- Bolsover, S., Wiedemann, C. "Biologie cellulaire et moléculaire" (2006). Dumod. 2^{ème} édition.

- Boukamp, P., R. T. Petrussevska, et al. (1988). "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." J Cell Biol **106**(3): 761-771.
- Boulais, N. and L. Misery (2008). "The epidermis: a sensory tissue." Eur J Dermatol **18**(2): 119-127.
- Boury-Jamot. (2011). "Thèse: Les aquaporines dans l'épiderme humain: expression, localisation et modification au cours de la différenciation.
- Boury-Jamot, M., R. Sougrat, et al. (2006). "Expression and function of aquaporins in human skin: Is aquaporin-3 just a glycerol transporter?" Biochim Biophys Acta **1758**(8): 1034-1042.
- Boyce, S. T. and R. G. Ham (1983). "Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture." J Invest Dermatol **81**(1 Suppl): 33s-40s.
- Brandner, J. M. (2009). "Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis." Eur J Pharm Biopharm **72**(2): 289-294.
- Brown, D. (2003). "The ins and outs of aquaporin-2 trafficking." Am J Physiol Renal Physiol **284**(5): F893-901.
- Cabodi, S., L. Moro, et al. (2004). "Integrin regulation of epidermal growth factor (EGF) receptor and of EGF-dependent responses." Biochem Soc Trans **32**(Pt3): 438-442.
- Campbell, R. E., O. Tour, et al. (2002). "A monomeric red fluorescent protein." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 7877-7882.
- Candi, E., R. Schmidt, et al. (2005). "The cornified envelope: a model of cell death in the skin." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(4): 328-340.
- Carbrey, J. M., D. A. Gorelick-Feldman, et al. (2003). "Aquaglyceroporin AQP9: solute permeation and metabolic control of expression in liver." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2945-2950.
- Carmosino, M., G. Procino, et al. (2007). "Trafficking and phosphorylation dynamics of AQP4 in histamine-treated human gastric cells." Biol Cell **99**(1): 25-36.
- Chen, W. Y., E. C. Bailey, et al. (1997). "Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(11): 5798-5803.
- Christophers, E. and A. M. Kligman (1964). "Visualization of the Cell Layers of the Stratum Corneum." J Invest Dermatol **42**: 407-409.

- Colosetti, P., R. E. Tunwell, et al. (2003). "The type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is concentrated at the tight junction level in polarized MDCK cells." J Cell Sci **116**(Pt 13): 2791-2803.
- Cooper, J. A. (1987). "Effects of cytochalasin and phalloidin on actin." J Cell Biol **105**(4): 1473-1478.
- Dale, B. A., J. A. Scofield, et al. (1983). "Identification of filaggrin in cultured mouse keratinocytes and its regulation by calcium." J Invest Dermatol **81**(1 Suppl): 90s-95s.
- de Groot, B. L., A. Engel, et al. (2003). "The structure of the aquaporin-1 water channel: a comparison between cryo-electron microscopy and X-ray crystallography." J Mol Biol **325**(3): 485-493.
- de Groot, B. L., T. Frigato, et al. (2003). "The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel." J Mol Biol **333**(2): 279-293.
- de Groot, B. L. and H. Grubmuller (2001). "Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF." Science **294**(5550): 2353-2357.
- Deen, P. M., M. A. Verdijk, et al. (1994). "Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine." Science **264**(5155): 92-95.
- Denker, B. M., B. L. Smith, et al. (1988). "Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules." J Biol Chem **263**(30): 15634-15642.
- DiColandrea, T., T. Karashima, et al. (2000). "Subcellular distribution of envoplakin and periplakin: insights into their role as precursors of the epidermal cornified envelope." J Cell Biol **151**(3): 573-586.
- Dorn, G. W., 2nd and T. Force (2005). "Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy." J Clin Invest **115**(3): 527-537.
- Ecelbarger, C. A., J. Terris, et al. (1995). "Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney." Am J Physiol **269**(5 Pt 2): F663-672.
- Eckert, R. L., M. B. Yaffe, et al. (1993). "Involucrin--structure and role in envelope assembly." J Invest Dermatol **100**(5): 613-617.
- Eichner, R., T. T. Sun, et al. (1986). "The role of keratin subfamilies and keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments." J Cell Biol **102**(5): 1767-1777.
- Elder, J. T., G. J. Fisher, et al. (1989). "Overexpression of transforming growth factor alpha in psoriatic epidermis." Science **243**(4892): 811-814.

- Elias, P. M., S. K. Ahn, et al. (2002). "Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers." J Invest Dermatol **119**(5): 1128-1136.
- Elias, P. M., B. E. Brown, et al. (1979). "Localization and composition of lipids in neonatal mouse stratum granulosum and stratum corneum." J Invest Dermatol **73**(5): 339-348.
- Etienne-Manneville, S. (2003). "[Conservative molecular mechanisms controlling cell polarity]." Med Sci (Paris) **19**(11): 1063-1065.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2001). "Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ ." Cell **106**(4): 489-498.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2003). "Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity." Nature **421**(6924): 753-756.
- Fisher, C., M. Blumenberg, et al. (1995). "Retinoid receptors and keratinocytes." Crit Rev Oral Biol Med **6**(4): 284-301.
- Fluhr, J. W., M. J. Behne, et al. (2004). "Stratum corneum acidification in neonatal skin: secretory phospholipase A2 and the sodium/hydrogen antiporter-1 acidify neonatal rat stratum corneum." J Invest Dermatol **122**(2): 320-329.
- Foskett, J. K., C. White, et al. (2007). "Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels." Physiol Rev **87**(2): 593-658.
- Freinkel R. K. ; Woodley D. "The biology of the skin". Parthenon Publishing, New-York 2001.
- Friedman M. H. "Principles and models of biological transport". Springer 2008
- Frigeri, A., M. A. Gropper, et al. (1995). "Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues." J Cell Sci **108 (Pt 9)**: 2993-3002.
- Fuchs, E. (2008). "Skin stem cells: rising to the surface." J Cell Biol **180**(2): 273-284.
- Fukata, M., M. Nakagawa, et al. (2003). "Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration." Curr Opin Cell Biol **15**(5): 590-597.
- Fukata, M., T. Watanabe, et al. (2002). "Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170." Cell **109**(7): 873-885.
- Furuichi, T., K. Kohda, et al. (1994). "Intracellular channels." Curr Opin Neurobiol **4**(3): 294-303.
- Furuse, M., M. Hata, et al. (2002). "Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice." J Cell Biol **156**(6): 1099-1111.

- Garcia, M. L. and E. E. Strehler (1999). "Plasma membrane calcium ATPases as critical regulators of calcium homeostasis during neuronal cell function." Front Biosci **4**: D869-882.
- Giusti, F., A. Martella, et al. (2001). "Skin barrier, hydration, and pH of the skin of infants under 2 years of age." Pediatr Dermatol **18**(2): 93-96.
- Goldstein, D. A. and A. K. Solomon (1960). "Determination of equivalent pore radius for human red cells by osmotic pressure measurement." J Gen Physiol **44**: 1-17.
- Goode, B. L., D. G. Drubin, et al. (2000). "Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons." Curr Opin Cell Biol **12**(1): 63-71.
- Gorin, M. B., S. B. Yancey, et al. (1984). "The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: characterization and structure based on cDNA cloning." Cell **39**(1): 49-59.
- Goud, B. and P. A. Gleeson (2010). "TGN golgins, Rabs and cytoskeleton: regulating the Golgi trafficking highways." Trends Cell Biol **20**(6): 329-336.
- Grayson, S., A. G. Johnson-Winegar, et al. (1985). "Lamellar body-enriched fractions from neonatal mice: preparative techniques and partial characterization." J Invest Dermatol **85**(4): 289-294.
- Gundersen, G. G., E. R. Gomes, et al. (2004). "Cortical control of microtubule stability and polarization." Curr Opin Cell Biol **16**(1): 106-112.
- Gustafson, C. E., S. Levine, et al. (1998). "Vasopressin regulated trafficking of a green fluorescent protein-aquaporin 2 chimera in LLC-PK1 cells." Histochem Cell Biol **110**(4): 377-386.
- Hara-Chikuma, M., E. Sohara, et al. (2005). "Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7-deficient mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation." J Biol Chem **280**(16): 15493-15496.
- Hara-Chikuma, M. and A. S. Verkman (2008). "Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing." J Mol Med (Berl) **86**(2): 221-231.
- Hara-Chikuma, M. and A. S. Verkman (2008). "Prevention of skin tumorigenesis and impairment of epidermal cell proliferation by targeted aquaporin-3 gene disruption." Mol Cell Biol **28**(1): 326-332.
- Hara-Chikuma, M. and A. S. Verkman (2008). "Roles of aquaporin-3 in the epidermis." J Invest Dermatol **128**(9): 2145-2151.

- Hara, M., T. Ma, et al. (2002). "Selectively reduced glycerol in skin of aquaporin-3-deficient mice may account for impaired skin hydration, elasticity, and barrier recovery." J Biol Chem **277**(48): 46616-46621.
- Hara, M. and A. S. Verkman (2003). "Glycerol replacement corrects defective skin hydration, elasticity, and barrier function in aquaporin-3-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(12): 7360-7365.
- Hays, R. M., J. Condeelis, et al. (1993). "The effect of vasopressin on the cytoskeleton of the epithelial cell." Pediatr Nephrol **7**(5): 672-679.
- Hennings, H., D. Michael, et al. (1980). "Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture." Cell **19**(1): 245-254.
- Heymann, J. B. and A. Engel (1999). "Aquaporins: Phylogeny, Structure, and Physiology of Water Channels." News Physiol Sci **14**: 187-193.
- Hibuse, T., N. Maeda, et al. (2005). "Aquaporin 7 deficiency is associated with development of obesity through activation of adipose glycerol kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(31): 10993-10998.
- Hibuse, T., N. Maeda, et al. (2006). "Aquaporins and glycerol metabolism." Biochim Biophys Acta **1758**(8): 1004-1011.
- Higuchi, S., M. Kubota, et al. (2007). "Transcriptional regulation of aquaporin 3 by insulin." J Cell Biochem **102**(4): 1051-1058.
- Hirokawa, N., Y. Noda, et al. (1998). "Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division." Curr Opin Cell Biol **10**(1): 60-73.
- Hirsch, T., S. von Peter, et al. (2006). "Adenoviral gene delivery to primary human cutaneous cells and burn wounds." Mol Med **12**(9-10): 199-207.
- Hohl, D., U. Lichti, et al. (1991). "Transcription of the human loricrin gene in vitro is induced by calcium and cell density and suppressed by retinoic acid." J Invest Dermatol **96**(4): 414-418.
- Hohl, D., T. Mehrel, et al. (1991). "Characterization of human loricrin. Structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins." J Biol Chem **266**(10): 6626-6636.
- Huff, C. A., S. H. Yuspa, et al. (1993). "Identification of control elements 3' to the human keratin 1 gene that regulate cell type and differentiation-specific expression." J Biol Chem **268**(1): 377-384.
- Hui, E. K. and D. P. Nayak (2002). "Role of G protein and protein kinase signalling in influenza virus budding in MDCK cells." J Gen Virol **83**(Pt 12): 3055-3066.

- Ikonen, E., M. Tagaya, et al. (1995). "Different requirements for NSF, SNAP, and Rab proteins in apical and basolateral transport in MDCK cells." Cell **81**(4): 571-580.
- Ishibashi, K. (2006). "Aquaporin subfamily with unusual NPA boxes." Biochim Biophys Acta **1758**(8): 989-993.
- Ishibashi, K., M. Imai, et al. (2000). "Cellular localization of aquaporin 7 in the rat kidney." Exp Nephrol **8**(4-5): 252-257.
- Jacobsen, F., J. Mertens-Rill, et al. (2006). "Nucleofection: a new method for cutaneous gene transfer?" J Biomed Biotechnol **2006**(5): 26060.
- Jung, J. S., G. M. Preston, et al. (1994). "Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model." J Biol Chem **269**(20): 14648-14654.
- Kahata, K., M. Hayashi, et al. (2004). "Regulation of transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein signalling by transcriptional coactivator GCN5." Genes Cells **9**(2): 143-151.
- Kalinin, A. E., A. V. Kajava, et al. (2002). "Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope." Bioessays **24**(9): 789-800.
- Kamsteeg, E. J., A. S. Duffield, et al. (2007). "MAL decreases the internalization of the aquaporin-2 water channel." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(42): 16696-16701.
- Kamsteeg, E. J., G. Hendriks, et al. (2006). "Short-chain ubiquitination mediates the regulated endocytosis of the aquaporin-2 water channel." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(48): 18344-18349.
- Kartasova, T., G. N. van Muijen, et al. (1988). "Novel protein in human epidermal keratinocytes: regulation of expression during differentiation." Mol Cell Biol **8**(5): 2204-2210.
- Katsura, T., C. E. Gustafson, et al. (1997). "Protein kinase A phosphorylation is involved in regulated exocytosis of aquaporin-2 in transfected LLC-PK1 cells." Am J Physiol **272**(6 Pt 2): F817-822.
- Katsura, T., J. M. Verbavatz, et al. (1995). "Constitutive and regulated membrane expression of aquaporin 1 and aquaporin 2 water channels in stably transfected LLC-PK1 epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7212-7216.
- Kishida, K., H. Kuriyama, et al. (2000). "Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes." J Biol Chem **275**(27): 20896-20902.

- Klussmann, E., G. Tamma, et al. (2001). "An inhibitory role of Rho in the vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells." J Biol Chem **276**(23): 20451-20457.
- Komander, D., G. S. Kular, et al. (2004). "Interactions of LY333531 and other bisindolyl maleimide inhibitors with PDK1." Structure **12**(2): 215-226.
- Kondo, H., I. Shimomura, et al. (2002). "Human aquaporin adipose (AQPap) gene. Genomic structure, promoter analysis and functional mutation." Eur J Biochem **269**(7): 1814-1826.
- Korting, H. C., K. Hubner, et al. (1990). "Differences in the skin surface pH and bacterial microflora due to the long-term application of synthetic detergent preparations of pH 5.5 and pH 7.0. Results of a crossover trial in healthy volunteers." Acta Derm Venereol **70**(5): 429-431.
- Kreepipuu, A., N. Blom, et al. (1999). "PhosphoBase, a database of phosphorylation sites: release 2.0." Nucleic Acids Res **27**(1): 237-239.
- Kuriyama, H., S. Kawamoto, et al. (1997). "Molecular cloning and expression of a novel human aquaporin from adipose tissue with glycerol permeability." Biochem Biophys Res Commun **241**(1): 53-58.
- Kuroda, S., M. Fukata, et al. (1997). "Regulation of cell-cell adhesion of MDCK cells by Cdc42 and Rac1 small GTPases." Biochem Biophys Res Commun **240**(2): 430-435.
- Kuroda, S., M. Fukata, et al. (1996). "Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1." J Biol Chem **271**(38): 23363-23367.
- Landmann, L. (1986). "Epidermal permeability barrier: transformation of lamellar granule-disks into intercellular sheets by a membrane-fusion process, a freeze-fracture study." J Invest Dermatol **87**(2): 202-209.
- Lapierre, L. A., R. Kumar, et al. (2001). "Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems." Mol Biol Cell **12**(6): 1843-1857.
- Lauf, U., P. Lopez, et al. (2001). "Expression of fluorescently tagged connexins: a novel approach to rescue function of oligomeric DsRed-tagged proteins." FEBS Lett **498**(1): 11-15.
- Li, S. Z., B. W. McDill, et al. (2007). "Calcineurin-NFATc signaling pathway regulates AQP2 expression in response to calcium signals and osmotic stress." Am J Physiol Cell Physiol **292**(5): C1606-1616.

- Lorand, L. and R. M. Graham (2003). "Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(2): 140-156.
- Ma, L., Y. G. Huang, et al. (2007). "Topiramate reduced sweat secretion and aquaporin-5 expression in sweat glands of mice." Life Sci **80**(26): 2461-2468.
- Ma, T., M. Hara, et al. (2002). "Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3." J Biol Chem **277**(19): 17147-17153.
- Ma, T., B. Yang, et al. (1998). "Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels." J Biol Chem **273**(8): 4296-4299.
- MacNeil, S. (2007). "Progress and opportunities for tissue-engineered skin." Nature **445**(7130): 874-880.
- Maeda, N., T. Funahashi, et al. (2004). "Adaptation to fasting by glycerol transport through aquaporin 7 in adipose tissue." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(51): 17801-17806.
- Martin, P. (1997). "Wound healing--aiming for perfect skin regeneration." Science **276**(5309): 75-81.
- Matsuzaki, T., T. Suzuki, et al. (2001). "Hypertonicity-induced expression of aquaporin 3 in MDCK cells." Am J Physiol Cell Physiol **281**(1): C55-63.
- Maunsbach, A. B., D. Marples, et al. (1997). "Aquaporin-1 water channel expression in human kidney." J Am Soc Nephrol **8**(1): 1-14.
- McGrath J.A.; Eady R.A.J.; Pope F.M. "Chapter 3: Anatomy and Organization of Human Skin". Rook's Textbook of Dermatology (Seventh Edition) 2008.
- Meldolesi, J. and T. Pozzan (1998). "The heterogeneity of ER Ca²⁺ stores has a key role in nonmuscle cell signaling and function." J Cell Biol **142**(6): 1395-1398.
- Meng, Y. G., J. Liang, et al. (2000). "Green fluorescent protein as a second selectable marker for selection of high producing clones from transfected CHO cells." Gene **242**(1-2): 201-207.
- Menon, G. K., S. Grayson, et al. (1985). "Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry." J Invest Dermatol **84**(6): 508-512.
- Michalak, M., J. M. Robert Parker, et al. (2002). "Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum." Cell Calcium **32**(5-6): 269-278.
- Mimori-Kiyosue, Y., N. Shiina, et al. (2000). "The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules." Curr Biol **10**(14): 865-868.

- Missiaen, L., W. Robberecht, et al. (2000). "Abnormal intracellular Ca^{2+} homeostasis and disease." Cell Calcium **28**(1): 1-21.
- Miyamura, Y., S. G. Coelho, et al. (2007). "Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation." Pigment Cell Res **20**(1): 2-13.
- Moller, C., D. Fotiadis, et al. (2003). "Determining molecular forces that stabilize human aquaporin-1." J Struct Biol **142**(3): 369-378.
- Morishita, Y., T. Matsuzaki, et al. (2005). "Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule." Mol Cell Biol **25**(17): 7770-7779.
- Mostov, K. E., M. Verges, et al. (2000). "Membrane traffic in polarized epithelial cells." Curr Opin Cell Biol **12**(4): 483-490.
- Mulders, S. M., G. M. Preston, et al. (1995). "Water channel properties of major intrinsic protein of lens." J Biol Chem **270**(15): 9010-9016.
- Murata, K., K. Mitsuoka, et al. (2000). "Structural determinants of water permeation through aquaporin-1." Nature **407**(6804): 599-605.
- Nedvetsky, P. I., E. Stefan, et al. (2007). "A Role of myosin Vb and Rab11-FIP2 in the aquaporin-2 shuttle." Traffic **8**(2): 110-123.
- Nejsum, L. N. (2005). "The renal plumbing system: aquaporin water channels." Cell Mol Life Sci **62**(15): 1692-1706.
- Nejsum, L. N., T. H. Kwon, et al. (2002). "Functional requirement of aquaporin-5 in plasma membranes of sweat glands." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 511-516.
- Nemes, Z., L. N. Marekov, et al. (1999). "Involucrin cross-linking by transglutaminase 1. Binding to membranes directs residue specificity." J Biol Chem **274**(16): 11013-11021.
- Ng, D. C., S. Shafae, et al. (2000). "Requirement of an AP-1 site in the calcium response region of the involucrin promoter." J Biol Chem **275**(31): 24080-24088.
- Nichols, G. E., J. C. Lovejoy, et al. (1986). "Isolation and characterization of two types of MDCK epithelial cell clones based on glycosphingolipid pattern." Biochim Biophys Acta **887**(1): 1-12.
- Nielsen, S., J. Frokiaer, et al. (2002). "Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine." Physiol Rev **82**(1): 205-244.

- Nielsen, S., B. L. Smith, et al. (1993). "Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(15): 7275-7279.
- Niessen, C. M. (2007). "Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function." J Invest Dermatol **127**(11): 2525-2532.
- Nihei, K., Y. Koyama, et al. (2001). "Immunolocalization of aquaporin-9 in rat hepatocytes and Leydig cells." Arch Histol Cytol **64**(1): 81-88.
- Nobes, C. D. and A. Hall (1999). "Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement." J Cell Biol **144**(6): 1235-1244.
- Noda, Y., S. Horikawa, et al. (2004). "Water channel aquaporin-2 directly binds to actin." Biochem Biophys Res Commun **322**(3): 740-745.
- Noda, Y. and S. Sasaki (2006). "Regulation of aquaporin-2 trafficking and its binding protein complex." Biochim Biophys Acta **1758**(8): 1117-1125.
- Noritake, J., T. Watanabe, et al. (2005). "IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration." J Cell Sci **118**(Pt 10): 2085-2092.
- Okahira, M., M. Kubota, et al. (2008). "Regulation of aquaporin 3 expression by magnesium ion." Eur J Pharmacol **588**(1): 26-32.
- Orzech, E., K. Schlessinger, et al. (1999). "Interactions of the AP-1 Golgi adaptor with the polymeric immunoglobulin receptor and their possible role in mediating brefeldin A-sensitive basolateral targeting from the trans-Golgi network." J Biol Chem **274**(4): 2201-2215.
- Pallone, T. L., B. K. Kishore, et al. (1997). "Evidence that aquaporin-1 mediates NaCl-induced water flux across descending vasa recta." Am J Physiol **272**(5 Pt 2): F587-596.
- Perez, F., G. S. Diamantopoulos, et al. (1999). "CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo." Cell **96**(4): 517-527.
- Pillai, S. and D. D. Bikle (1992). "Adenosine triphosphate stimulates phosphoinositide metabolism, mobilizes intracellular calcium, and inhibits terminal differentiation of human epidermal keratinocytes." J Clin Invest **90**(1): 42-51.
- Pisano, M. M. and A. B. Chepelinsky (1991). "Genomic cloning, complete nucleotide sequence, and structure of the human gene encoding the major intrinsic protein (MIP) of the lens." Genomics **11**(4): 981-990.

- Preston, G. M. and P. Agre (1991). "Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(24): 11110-11114.
- Preston, G. M., T. P. Carroll, et al. (1992). "Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein." Science **256**(5055): 385-387.
- Preston, G. M., J. S. Jung, et al. (1993). "The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel." J Biol Chem **268**(1): 17-20.
- Proksch, E., J. M. Brandner, et al. (2008). "The skin: an indispensable barrier." Exp Dermatol **17**(12): 1063-1072.
- Prudente, S., E. Flex, et al. (2007). "A functional variant of the adipocyte glycerol channel aquaporin 7 gene is associated with obesity and related metabolic abnormalities." Diabetes **56**(5): 1468-1474.
- Qualmann, B. and H. Mellor (2003). "Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases." Biochem J **371**(Pt 2): 233-241.
- Richardson, J. C., V. Scalera, et al. (1981). "Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments." Biochim Biophys Acta **673**(1): 26-36.
- Rodriguez, A., V. Catalan, et al. (2006). "Role of aquaporin-7 in the pathophysiological control of fat accumulation in mice." FEBS Lett **580**(20): 4771-4776.
- Rojek, A., J. Praetorius, et al. (2008). "A current view of the mammalian aquaglyceroporins." Annu Rev Physiol **70**: 301-327.
- Rojek, A. M., M. T. Skowronski, et al. (2007). "Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3609-3614.
- Roland, J. T., A. K. Kenworthy, et al. (2007). "Myosin Vb interacts with Rab8a on a tubular network containing EHD1 and EHD3." Mol Biol Cell **18**(8): 2828-2837.
- Sabolic, I., T. Katsura, et al. (1995). "The AQP2 water channel: effect of vasopressin treatment, microtubule disruption, and distribution in neonatal rats." J Membr Biol **143**(3): 165-175.
- Sabolic, I., G. Valenti, et al. (1992). "Localization of the CHIP28 water channel in rat kidney." Am J Physiol **263**(6 Pt 1): C1225-1233.
- Schuyler, S. C. and D. Pellman (2001). "Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning." Cell **105**(4): 421-424.

- Shiels, A., S. Bassnett, et al. (2001). "Optical dysfunction of the crystalline lens in aquaporin-0-deficient mice." Physiol Genomics **7**(2): 179-186.
- Snapp, E. L., R. S. Hegde, et al. (2003). "Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions." J Cell Biol **163**(2): 257-269.
- Sougrat, R., M. Morand, et al. (2002). "Functional expression of AQP3 in human skin epidermis and reconstructed epidermis." J Invest Dermatol **118**(4): 678-685.
- Stephens, P., P. Grenard, et al. (2004). "Crosslinking and G-protein functions of transglutaminase 2 contribute differentially to fibroblast wound healing responses." J Cell Sci **117**(Pt 15): 3389-3403.
- Steven, A. C., M. E. Bisher, et al. (1990). "Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin--two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes." J Struct Biol **104**(1-3): 150-162.
- Su, M. J., D. D. Bikle, et al. (1994). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 potentiates the keratinocyte response to calcium." J Biol Chem **269**(20): 14723-14729.
- Subramanian, K. and T. Meyer (1997). "Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores." Cell **89**(6): 963-971.
- Sugiyama, Y., Y. Ota, et al. (2001). "Osmotic stress up-regulates aquaporin-3 gene expression in cultured human keratinocytes." Biochim Biophys Acta **1522**(2): 82-88.
- Sullivan M.; Nicholls J." The Nutritional Approach to Experimental Dermatology". J Invest Dermatol. 1940 ; 3(4):309–316.
- Sun, T. X., A. Van Hoek, et al. (2002). "Aquaporin-2 localization in clathrin-coated pits: inhibition of endocytosis by dominant-negative dynamin." Am J Physiol Renal Physiol **282**(6): F998-1011.
- Tajika, Y., T. Matsuzaki, et al. (2005). "Differential regulation of AQP2 trafficking in endosomes by microtubules and actin filaments." Histochem Cell Biol **124**(1): 1-12.
- Tajika, Y., T. Matsuzaki, et al. (2004). "Aquaporin-2 is retrieved to the apical storage compartment via early endosomes and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway." Endocrinology **145**(9): 4375-4383.
- Tajika, Y., T. Matsuzaki, et al. (2002). "Immunohistochemical characterization of the intracellular pool of water channel aquaporin-2 in the rat kidney." Anat Sci Int **77**(3): 189-195.
- Takata, K. (2006). "Aquaporin-2 (AQP2): its intracellular compartment and trafficking." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **52**(7): 34-39.

- Takata, K., T. Matsuzaki, et al. (2004). "Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane." Prog Histochem Cytochem **39**(1): 1-83.
- Takata, K., T. Matsuzaki, et al. (2008). "Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney." Histochem Cell Biol **130**(2): 197-209.
- Tamma, G., E. Klusmann, et al. (2003). "cAMP-induced AQP2 translocation is associated with RhoA inhibition through RhoA phosphorylation and interaction with RhoGDI." J Cell Sci **116**(Pt 8): 1519-1525.
- Tanaka, M., N. Inase, et al. (1997). "Induction of aquaporin 3 by corticosteroid in a human airway epithelial cell line." Am J Physiol **273**(5 Pt 1): L1090-1095.
- Terasaki, M., N. T. Slater, et al. (1994). "Continuous network of endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(16): 7510-7514.
- Tobin, D. J. (2006). "Biochemistry of human skin--our brain on the outside." Chem Soc Rev **35**(1): 52-67.
- Tsai, P. F., S. J. Lin, et al. (2011). "Interplay between PKCdelta and Sp1 on histone deacetylase inhibitor-mediated Epstein-Barr virus reactivation." J Virol **85**(5): 2373-2385.
- van Balkom, B. W., P. J. Savelkoul, et al. (2002). "The role of putative phosphorylation sites in the targeting and shuttling of the aquaporin-2 water channel." J Biol Chem **277**(44): 41473-41479.
- Verbavatz, J. M., D. Brown, et al. (1993). "Tetrameric assembly of CHIP28 water channels in liposomes and cell membranes: a freeze-fracture study." J Cell Biol **123**(3): 605-618.
- Verbavatz, J. M., A. N. Van Hoek, et al. (1994). "A 28 kDa sarcolemmal antigen in kidney principal cell basolateral membranes: relationship to orthogonal arrays and MIP26." J Cell Sci **107** (Pt 4): 1083-1094.
- Vielhaber, G., S. Pfeiffer, et al. (2001). "Localization of ceramide and glucosylceramide in human epidermis by immunogold electron microscopy." J Invest Dermatol **117**(5): 1126-1136.
- Vignais, M. L. (1999). "[Cellular signaling in response to TGFbeta: the paradox of a factor that blocks cell proliferation and enhances metastasis]." Bull Cancer **86**(11): 903-910.
- Visscher, M. O., R. Chatterjee, et al. (2000). "Changes in diapered and nondiapered infant skin over the first month of life." Pediatr Dermatol **17**(1): 45-51.
- Von Heijne G. "Membrane channels". Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry, 2003.

- Vossenkamper, A., P. I. Nedvetsky, et al. (2007). "Microtubules are needed for the perinuclear positioning of aquaporin-2 after its endocytic retrieval in renal principal cells." Am J Physiol Cell Physiol **293**(3): C1129-1138.
- Ward, P. D., R. R. Klein, et al. (2002). "Phospholipase C-gamma modulates epithelial tight junction permeability through hyperphosphorylation of tight junction proteins." J Biol Chem **277**(38): 35760-35765.
- Watanabe, R., K. Wu, et al. (1998). "Up-regulation of glucosylceramide synthase expression and activity during human keratinocyte differentiation." J Biol Chem **273**(16): 9651-9655.
- Watanabe, T., S. Wang, et al. (2004). "Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration." Dev Cell **7**(6): 871-883.
- Watt, F. M. (1984). "Selective migration of terminally differentiating cells from the basal layer of cultured human epidermis." J Cell Biol **98**(1): 16-21.
- Weiler, F., T. Marbe, et al. (2005). "Influence of protein kinase C on transcription of the tight junction elements ZO-1 and occludin." J Cell Physiol **204**(1): 83-86.
- Weissbach, L., J. Settleman, et al. (1994). "Identification of a human rasGAP-related protein containing calmodulin-binding motifs." J Biol Chem **269**(32): 20517-20521.
- Weisz, O. A. and E. Rodriguez-Boulan (2009). "Apical trafficking in epithelial cells: signals, clusters and motors." J Cell Sci **122**(Pt 23): 4253-4266.
- Werth, P. (2006). "Biochemistry of human stratum corneum lipids" Taylor and Francis. New-york: 33-42.
- Williams, S., T. Mustoe, et al. (2005). "CpG-island fragments from the HNRPA2B1/CBX3 genomic locus reduce silencing and enhance transgene expression from the hCMV promoter/enhancer in mammalian cells." BMC Biotechnol **5**: 17.
- Xie, Z. and D. D. Bikle (1997). "Cloning of the human phospholipase C-gamma1 promoter and identification of a DR6-type vitamin D-responsive element." J Biol Chem **272**(10): 6573-6577.
- Yamaguchi, Y., M. Brenner, et al. (2007). "The regulation of skin pigmentation." J Biol Chem **282**(38): 27557-27561.
- Yasui, H., M. Kubota, et al. (2008). "Membrane trafficking of aquaporin 3 induced by epinephrine." Biochem Biophys Res Commun **373**(4): 613-617.

- Yasukawa, K., D. Sawamura, et al. (2007). "Histone deacetylase inhibitors preferentially augment transient transgene expression in human dermal fibroblasts." Br J Dermatol **157**(4): 662-669.
- Young, B and Heath, J (2000). "Weather's functional histology." Harcourt Publishes limited. Fourth edition
- Yuspa, S. H., A. E. Kilkeny, et al. (1989). "Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro." J Cell Biol **109**(3): 1207-1217.
- Zahraoui, A., D. Louvard, et al. (2000). "Tight junction, a platform for trafficking and signaling protein complexes." J Cell Biol **151**(5): F31-36.
- Zeidel, M. L., S. V. Ambudkar, et al. (1992). "Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein." Biochemistry **31**(33): 7436-7440.
- Zeidel, M. L., S. Nielsen, et al. (1994). "Ultrastructure, pharmacologic inhibition, and transport selectivity of aquaporin channel-forming integral protein in proteoliposomes." Biochemistry **33**(6): 1606-1615.
- Zelenina, M., S. Zelenin, et al. (2002). "Water permeability of aquaporin-4 is decreased by protein kinase C and dopamine." Am J Physiol Renal Physiol **283**(2): F309-318.
- Zhang, R., A. N. van Hoek, et al. (1993). "A point mutation at cysteine 189 blocks the water permeability of rat kidney water channel CHIP28k." Biochemistry **32**(12): 2938-2941.
- Zheng, X. and W. Bollinger Bollag (2003). "Aquaporin 3 colocalizes with phospholipase d2 in caveolin-rich membrane microdomains and is downregulated upon keratinocyte differentiation." J Invest Dermatol **121**(6): 1487-1495.